



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Dpto. Química Física Aplicada



Consejo Superior de Investigaciones científicas.
Instituto del frío.
Dpto. Metabolismo y Nutrición

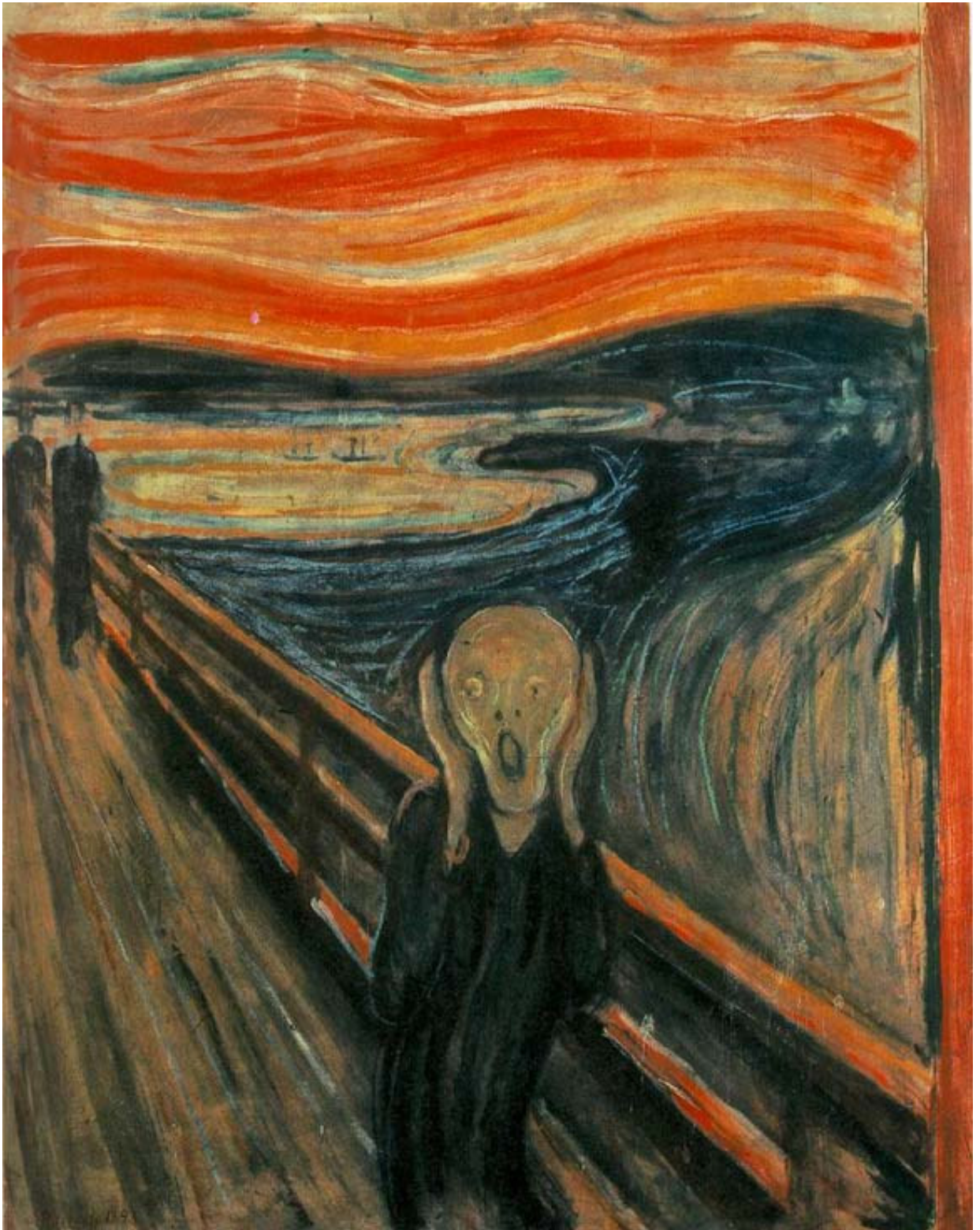
FIBRA DIETÉTICA EN BEBIDAS DE LA DIETA. DETERMINACIÓN, COMPOSICIÓN, Y CONTRIBUCIÓN A LA INGESTA DE FIBRA

TESIS DOCTORAL

AUTOR: M. ELENA DÍAZ RUBIO.

DIRECTOR: FULGENCIO SAURA-CALIXTO.

MADRID, 2008



Todos nacemos locos. Algunos continúan así siempre.

(Samuel Beckett)

Me lo contaron y lo olvidé. Lo vi y lo entendí. Lo hice y lo aprendí.

(Confucio, 551-479 a. C.)

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis, el Dr. Fulgencio Saura-Calixto, por sus enseñanzas y apoyo constante, por confiar en mí y darme la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

A Isabel Goñi, por su inestimable colaboración y asesoramiento en parte de la tesis.

Al Instituto Danone por concederme la financiación necesaria para poder llevar a cabo este trabajo de investigación.

A la Universidad Autónoma de Madrid y a Guillermo Reglero, mi tutor durante la etapa de docencia (siempre disponible para ayudarme con mis papeles).

Al Centro de Microscopia y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid, por permitirme utilizar sus instalaciones del laboratorio de microscopia electronica, por su asesoramiento y colaboración.

A todo el Instituto del frío, personal gestor y administrativo, por su ayuda y asesoramiento.

A todos los “topillos” de Metabolismo y Nutrición. Sin su apoyo esta tesis nunca habría visto la luz al final del tunel.

Gracias a Irene se fraguó mi amistad con el cromatógrafo de gases y con Lecumberri supe lo que era medir “Folin” cual Speedy Gonzáles (rápido y bien). Con Ana llegaron los mejores regalos de cumpleaños para todos. Gracias a Lupita, por sus sabios consejos, y a Sara que ha soportado mi “parloteo” como nadie, a Jara, sin cuyo apoyo logístico, la administración y los papeles de la tesis me habrían sepultado. Gracias a Jose,(¿para cuando la siguiente fermentación?), por su apoyo y a mis salmantinas favoritas Maria y Raquel, que tanto me habeis sufrido y aguantado los últimos meses.

Al Resto de integrantes del Departamento desde las nuevas incorporaciones, como Inma o Cristina, hasta el personal más veterano (Isabel y M^a Rosa), muchas gracias por estar ahí.

Finalmente aunque no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia, sobretudo a mis padres y mis hermanos el apoyo mostrado durante estos años. Que han sufrido esta tesis como si fuera la suya. POR FIN HEMOS TERMINADO!!!

ÍNDICE

Índice general.	i
ABREVIATURAS	ii
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.	3
ANTECEDENTES.	7
I. Fibra Diética. Generalidades.	
II. Fibra Diética Soluble en alimentos..	
1. Hemicelulosas solubles en agua	
2. Sustancias pécticas ó pectinas.	
3. Gomas y Mucílagos	
III. Ingesta de Fibra Dietética. Recomendaciones...	
IV. Principales efectos y propiedades de la fibra soluble..	
1. Propiedades tecnológicas, fisico-químicas ó funcionales	
2. Propiedades nutricionales y /o fisiológicas.	
V. Principales compuestos asociados a la fibra dietética soluble	
1. Compuestos fenólicos	
2. Proteína asociada a la fibra.	
3. Otros compuestos	
METODOLOGÍA	33
I. Análisis de Fibra. Antecedentes	
II. Principios de método de determinación de Fibra dietética en Bebidas y compuestos asociados..	
1. Principios	
2. Desarrollo del método	
MATERIALES Y MÉTODOS	49
I. Muestras	
II. Reactivos	
III. Equipos	
IV. Otros materiales	
V. Métodos experimentales	
1. Método para aislar el complejo de fibra dietética soluble	
2. Determinación del contenido en fibra soluble (polisacáridos) y sus constituyentes	
3. Determinación de compuestos fenólicos	
4. Determinación de actividad antioxidante	
5. Fermentación colónica <i>in vitro</i>	

6. Determinación de proteína total soluble y soluble no digerible	
7. Tests y análisis específicos	
8 Análisis Estadístico	
FIBRA DIETÉTICA Y COMPUESTOS ASOCIADOS EN BEBIDAS	63
I. VINO	67
I. <i>Antecedentes</i>	
II. <i>Materiales y métodos</i>	
III. <i>Resultados y Discusión</i>	
II. CERVEZA	109
I. <i>Antecedentes</i>	
II. <i>Materiales y métodos</i>	
III. <i>Resultados y Discusión</i>	
III. CAFE	137
I. <i>Antecedentes</i>	
II. <i>Materiales y métodos</i>	
III. <i>Resultados y Discusión</i>	
IV. OTRAS BEBIDAS	171
I. <i>Antecedentes</i>	
II. <i>Materiales y métodos</i>	
III. <i>Resultados y Discusión</i>	
FERMENTACIÓN COLÓNICA <i>in vitro</i> DEL COMPLEJO DE FIBRA EN CIERTAS BEBIDAS	223
I. <i>Antecedentes</i>	
II. <i>Materiales y métodos</i>	
III. <i>Resultados y Discusión</i>	
CONTRIBUCIÓN DE LAS BEBIDAS A LA INGESTA DE FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE	251
CONCLUSIONES	271
ANEXO I. COMPLEJO DE FIBRA DIETÉTICA. DETERMINACIÓN GRAVIMETRICA	275
ANEXO II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	283
BIBLIOGRAFIA	293
APENDICE. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	325
I. <i>Listado de tablas</i>	
II. <i>Listado de figuras</i>	

ABREVIATURAS.

AACC: American Association of Cereal Chemists.

AGCC:ácidos grasos de cadena corta (SCFA)

AG: arabinogalactano.

AGP: arabinogalactano proteína

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

AX: arabinoxilano

AX-SA: arabinoxilano soluble en agua

APM: alto peso molecular

Az. N: azúcares neutros.

Ac.U: ácidos urónicos

B.O.E: Boletín Oficial del Estado.

BPM: bajo peso molecular.

CGL: cromatografía gas-líquido.

CLAE: cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

DMS:dimetilsulfóxido.

FD: fibra dietética

FDI: fibra dietética insoluble.

FDS: fibra dietética soluble.

FDT: fibra Dietética total.

GM: galactomananos.

HG: homogalacturonano.

HRGPS: hidroxiprolinas

KDa:kilodalton.

LK: lignina Klason.

MAPA: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación

MEG:métodos enzimático gravimétricos

MEQ: métodos enzimático químicos.

NDC:Neohesperidina DC.

NSP: polisacáridos no amiláceos

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PM: peso molecular.

PP:polifenoles

PRP: prolina.

PRT:proteína.

PS:Polisacáridos

RG: ramnocalcturonano.

SB: sobrenadante.

SC: capacidad de hinchamiento..

RNF: residuo no fermentado.

WHC/WBC: capacidad de retención de agua

XG: xilocalacturonano.

Las tablas de composición de alimentos atribuyen un valor cero o no detectado al contenido de fibra dietética en bebidas, esto es principalmente consecuencia de la aplicación de los métodos oficiales de análisis (AOAC). La baja concentración de fibra (en comparación con otros alimentos sólidos de origen vegetal), así como su solubilidad en el medio etanólico, empleado para precipitar la fibra soluble en el método AOAC conlleva una precipitación incompleta de la misma y la co-precipitación de otros compuestos que no son constituyentes de fibra dietética. Ello indica la necesidad de emplear un método específico para la determinación de fibra dietética en bebidas.

Las bebidas alcohólicas y no alcohólicas comunes en la dieta pueden tener cantidades significativas de fibra dietética soluble procedente de las materias primas utilizadas para su elaboración. Para su determinación es necesario utilizar métodos específicos diferenciados de los comúnmente aplicados en alimentos sólidos.

En estudios anteriores de nuestro grupo de investigación se ha descrito la presencia en cantidades apreciables de compuestos bioactivos, principalmente polifenólicos, asociados a la matriz de la fibra, formando complejos indigestibles con polisacáridos y proteína resistente. Es posible que la fibra dietética de bebidas también contenga compuestos diferentes a los polisacáridos.

Por otra parte las ingestas de fibra dietética en dietas de grupos específicos y poblaciones así como los estudios nutricionales y epidemiológicos, contemplan exclusivamente la fibra dietética de alimentos vegetales sólidos. No obstante es posible que las bebidas de la dieta también contribuyan a la ingesta de fibra dietética total de la dieta y a los efectos fisiológicos y nutricionales de la misma.

Es por ello que los **objetivos** de esta tesis han sido los siguientes.

- Desarrollo de un método analítico específico para la determinación de fibra soluble en bebidas.
- Aplicación de este método al análisis de las bebidas más consumidas de la dieta española.
- Determinar los principales compuestos asociados a esta fibra soluble (compuestos fenólicos y proteína resistente), así como su capacidad antioxidante
- Determinar la contribución de la fibra dietética soluble de estas bebidas a la ingesta de fibra en la población española

Los estudios realizados en esta memoria se engloban dentro de los siguientes proyectos:

Proyecto del Ministerio de Educación y Ciencia AGL -2004--07579-C04-01/ALI. "Establecimiento de bases científicas para el uso de fibra dietética antioxidante y fracciones polifenólicas de uva en la prevención de cáncer colorrectal".

Proyecto 4.4 CONSUMERPRODUCTS perteneciente al proyecto europeo SEAFOODplus (framework programme VI) Coordinado por el Profesor Torger Borresen.

Acción europea Cost 926 "Impact of new technologies on the health benefits and safety of biactive plants compounds"

Otros trabajos específicos de investigación en colaboración con el Instituto Danone y diferentes empresas (Hispanagar, S.A.; Hero, S. A.)

ANTECEDENTES

I. FIBRA DIETÉTICA. GENERALIDADES.

Hasta fechas recientes la nutrición ha centrado su atención en los componentes digestibles de los alimentos: proteínas, grasas, hidratos de carbono, minerales y vitaminas. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha producido un creciente aumento en la investigación en fibra dietética y otros compuestos bioactivos y fotoquímicos, así como su incorporación de una manera natural a la dieta habitual. Una elevada ingesta de fibra además de contribuir a la regulación intestinal, esta correlacionada con un menor riesgo de padecer patologías relacionadas con el aparato digestivo, así como contribuye a la prevención de enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (Anderson y col. 1990; Kritchevsky 1999; Anderson, 2000; Jalili, y col., 2001; Bingham y col, 2003; Devin y col. 2007).

El concepto de Fibra dietética ha estado sujeto a multitud de variaciones, generándose una gran evolución desde la definición propuesta por Hipsley en 1953 (Hipsley, 1953) en la que definía fibra dietética como la suma de hemicelulosa, celulosa y lignina en alimentos (en otras palabras los componentes de las paredes celulares de las plantas que encontramos en alimentos), hasta las definiciones actualmente aceptadas (De Vries, 2004): la definición propuesta por la AOAC que define fibra dietética como los polisacáridos, lignina y sustancias asociadas presentes en las paredes celulares de los alimentos de origen vegetal que son resistentes a la (hidrólisis) digestión de las enzimas presentes en el cuerpo humano (en esta definición realmente se define un macroconstituyente de los alimentos que incluye celulosa, hemicelulosa, lignina, gomas, celulosa modificada, mucílagos, oligosacáridos y pectinas, así como ceras, cutina y suberina); la definición adoptada por la AACCC (American Association of Cereal Chemists) en la que define fibra dietética como "la porción comestible del alimento o carbohidratos análogos, que resisten el proceso de digestión y absorción en el intestino delgado, llegando intactos al colon, donde pueden fermentar total o parcialmente o la definición propuesta por Saura-Calixto y col. (2000) que acuña el término de fracción indigerible "parte de los alimentos de origen vegetal que no es digerida y absorbida en el intestino delgado y llega al colon donde es fermentada por la microflora bacteriana"

Fibra dietética incluye polisacáridos, oligosacáridos, lignina y compuestos asociados a las paredes celulares de las plantas que resisten igualmente el proceso de digestión. La fibra dietética promueve efectos fisiológicos beneficiosos, como la disminución de colesterol y glucosa en sangre. Bajo la denominación de fibra dietética (FD) se incluyen un amplio grupo de sustancias que forman parte de la estructura de las paredes celulares de los vegetales. Los principales componentes son polisacáridos como celulosa, hemicelulosas, pectinas, gomas, mucílagos y otros componentes no polisacáridos entre los que destaca la lignina.

Contrariamente a lo que sucede con el resto de nutrientes, la fibra no es atacada por las enzimas

del estómago y del intestino delgado, por lo que llega al colon sin degradar. Allí sufre en mayor o menor grado, según su composición, un proceso de fermentación por las bacterias intestinales y la parte no fermentada es excretada.

En general la fibra consta de dos fracciones (fibra dietética soluble y fibra dietética insoluble en agua) y las propiedades de la fibra vendrán determinadas por los porcentajes de estas dos fracciones. Desde el punto de vista químico se considera fibra dietética soluble aquella fracción soluble en tampón pH 7.5 a 100°C, mientras que desde el punto de vista fisiológico se considera fracción soluble a la fibra dietética soluble a 37°C.

La **fibra dietética soluble** (pectinas, gomas, mucilagos, algunas hemicelulosas), tiene elevada capacidad de retención de agua, forma soluciones viscosas y es fermentada en mayor proporción en el colon o intestino grueso por la flora intestinal (Lunn y Buttriss, 2007).

La **fibra dietética insoluble** (lignina, celulosa, resto de hemicelulosas no solubles) es escasamente fermentada. Su principal efecto en el organismo es disminuir el tiempo de tránsito de los alimentos a través del tubo digestivo. Como consecuencia este tipo de fibra al ingerirse diariamente previene estreñimiento

La fibra dietética se encuentra en todos los alimentos de origen vegetal, en legumbres, verduras y hortalizas, frutas, frutos secos, cereales de grano entero y productos elaborados con dichos alimentos. Todos ellos tienen una mezcla de ambos tipos de fibra (tabla 1).

La fibra dietética es cuantitativamente el ingrediente mas empleado en alimentos funcionales, pues representa mas del 50 % de los ingredientes que se emplean actualmente. El desarrollo de concentrados de fibra y alimentos enriquecidos en fibra es una actividad de creciente interés en la industria alimentaria debido a la elevada pero diferenciada demanda. Existe numerosas fibras con propiedades muy diferentes que se añaden a un cada vez mayor número de productos: lácteos, cárnicos, bebidas, derivados de cereales.

Tabla 1. Fibra dietética en alimentos

	Fibra Dietética ^a (g por 100g porción comestible)		
	Soluble	Insoluble	Total
Cereales y derivados			
Harina de Avena (grano medio)	3.7	2.9	6.6
Salvado de trigo	3.8	32.2	36.0
Arroz cocido	0.51	1.85	2.36
Pasta (Spaghetti)	1.89	2.08	3.97
Legumbres			
Judías blancas	4.56	8.95	13.51
Judías pintas	6.99	8.41	15.40
Lentejas	1.6	11.31	12.91
Guisantes	3.23	9.9	13.13
Frutas y frutos secos			
Manzanas	0.6	1.0	1.6
Naranjas	1.4	0.7	2.1
Platanos	0.7	0.4	1.1
Nueces	1.5	2.0	3.5
Vegetales y otras Hortalizas			
Coles de bruselas	3.0	2.6	5.6
Lechuga	0.6	0.6	1.2
Patatas hervidas	4.28	2.18	6.46
Tomate	0.4	0.7	1.1
Zanahoria	1.4	1.0	2.4

^a Valores tomados de Food Standards Agency. (2002) y Saura-Calixto y col (2000)

II. FIBRA SOLUBLE EN ALIMENTOS.

Los métodos actuales de análisis de fibra dietética consideran fibra soluble a la fracción de fibra que es soluble a 100°C y pH=6-7 (Prosky, 1988, Englyst y Cummings, 1988).

Constituida por pectinas, ciertas hemicelulosas, gomas, mucílagos es capaz de formar geles y absorber agua con gran facilidad, enlentece el tránsito intestinal. Es fermentable y sirve de sustrato a las bacterias intestinales.

En general las hemicelulosas se encuentran en los mismos alimentos que la celulosa, así como en distintas frutas, las pectinas las hallamos en muchas frutas, como manzanas, naranjas, limones; (en los cítricos abunda en la capa blanquecina existente entre la cáscara y el interior comestible); y las gomas y mucílagos se encuentran fundamentalmente en frutas, legumbres, en la cebada y la avena (tabla 2)

Tabla 2. Presencia de fibra soluble e insoluble en diferentes alimentos^a

Fibra dietética	Componente	Alimento ó producto alimenticio
Insoluble	Celulosa	Harina de trigo entera
		Cáscara de grano de cereal
		Tegumento de legumbres
		Vegetales de hoja (acelgas, lechuga)
		Otros vegetales y hortalizas (guisantes, zanahorias)
Soluble	Hemicelulosas	Frutas
		Algunos cereales como cebada y avena
	Sustancias pécticas	Endospermo del grano de trigo
		Mayoritarias en manzana, uva, cítricos
		Algas comestibles
	Gomas y mucílagos	Cáscara plantago ovata
		Semilla de acacia
		Semilla de algarroba

^a Datos tomados de Cho y Dreher (2001), Lunn y Buttriss (2007)

La fracción de fibra soluble engloba (figura 1) :

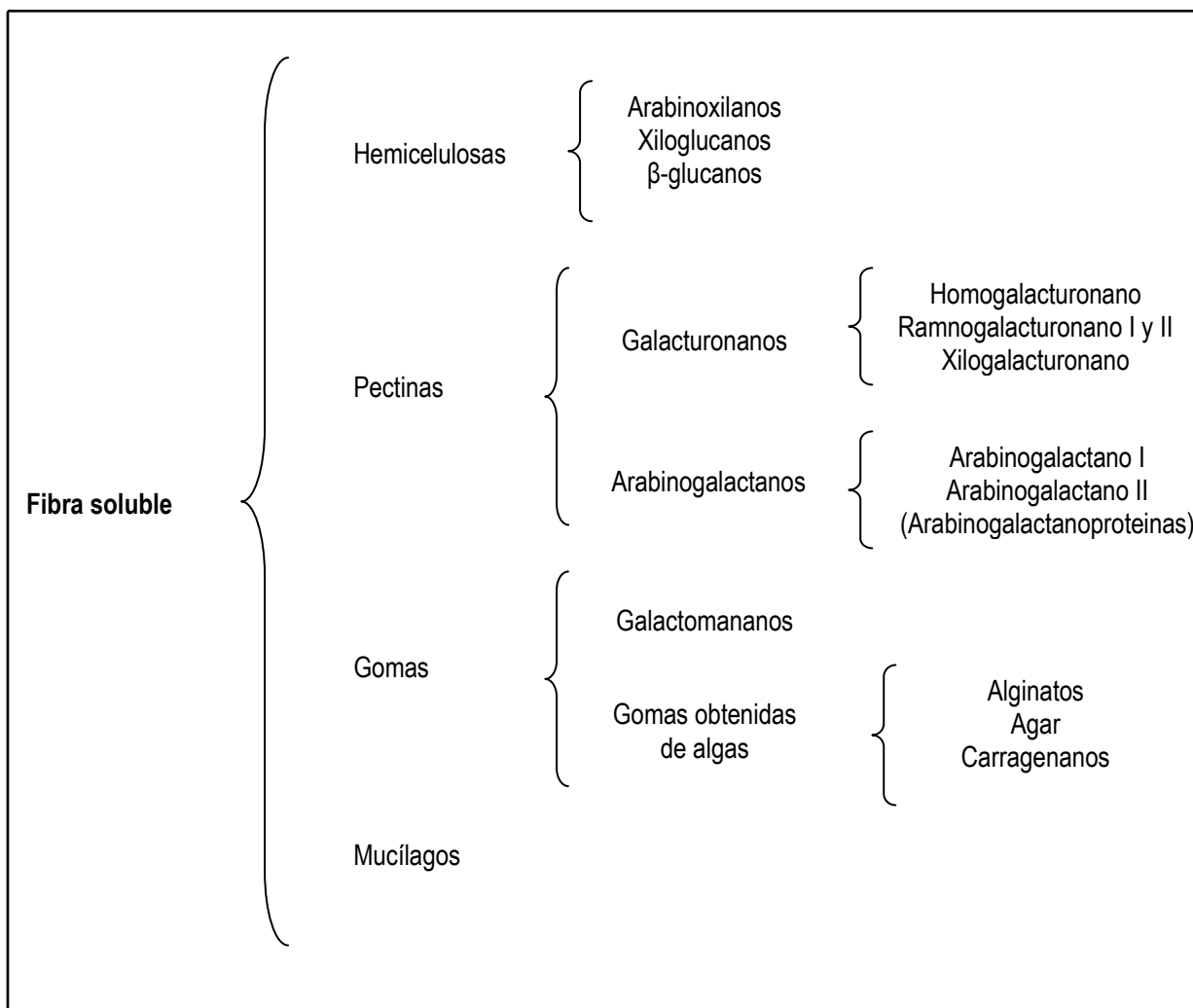
1. Hemicelulosas solubles en agua

Las hemicelulosas forman un grupo heterogéneo de polisacáridos; podemos distinguir son de dos clases, hemicelulosa A (es insoluble en agua y suele aparecer fuertemente asociada a la celulosa) y hemicelulosa ó Fracción B (soluble en agua) (Muralikrishna y Subba Rao, 2007). Las hemicelulosas soluble en agua, forman parte de la fibra dietética soluble y al contrario de la celulosa pueden contener otros glúcidos además de la glucosa, por ejemplo la xilosa o la arabinosa.

Los arabinoxilanos (pentosanos), se encuentran sobre todo en los cereales, mientras que los xiloglucanos predominan en las frutas y legumbres. Los elementos y su combinación, la longitud de las cadenas y su grado de ramificación determinan las propiedades fisicoquímicas de las hemicelulosas. Por

ejemplo, los beta-glucanos solubles de la avena y la cebada pueden absorber tal cantidad de agua que forman mucílagos muy viscosos.

Figura 1. Principales componentes de la fibra soluble



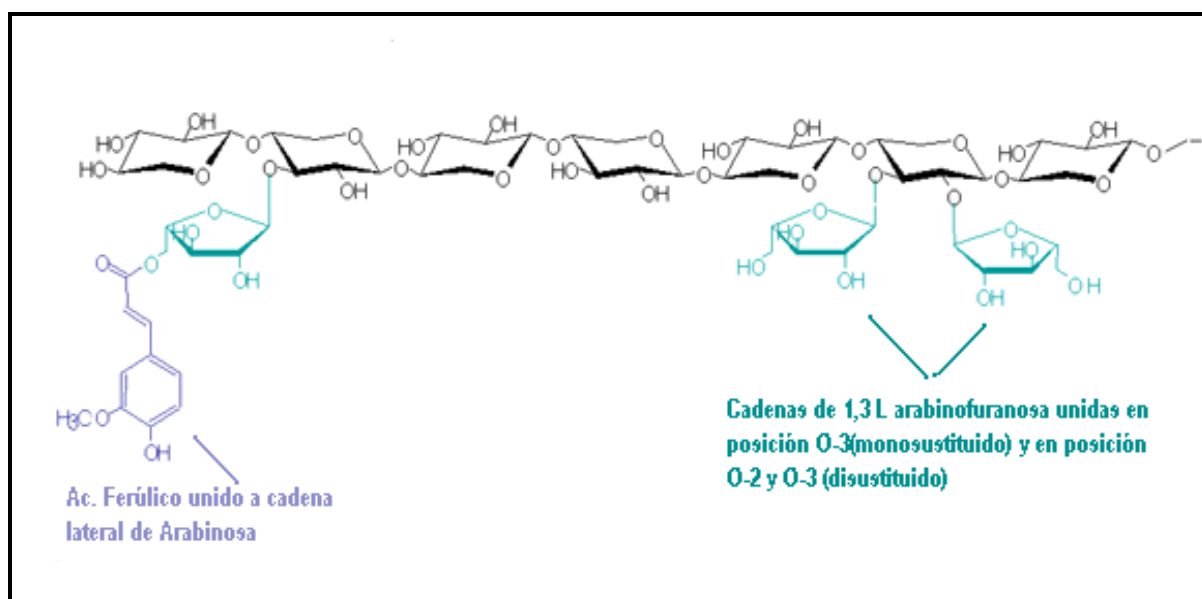
Los principales polisacáridos hemicelulósicos son xiloglucanos, arabinoxilanos, β-glucanos.

a) Arabinoxilanos. Son los principales polisacáridos no amiláceos presentes en el trigo. Están formados por un esqueleto o eje central de unidades de xilosa unidas entre sí por enlaces β(1-4) que presenta sustituciones con cadenas laterales de arabinosa en la posición C-3 (monosustituido), en posiciones C-2 y C3 (disustituido) (figura 2). En ocasiones puede encontrarse sin cadenas laterales, en cuyo caso suelen denominarse simplemente xilanos.

El tipo y distribución de los sustituyentes determinan el grado de asociación de la molécula a la celulosa, así como su solubilidad. Un aumento en el grado de sustitución disminuye su asociación a la

celulosa y por tanto aumenta su solubilidad en agua. De este modo podemos distinguir dos tipos de arabinoxilanos: arabinoxilanos extraíbles ó solubles en agua (Sorensen, Meyer, Pedersen, 2003; Gruppen, 1992) y aquellos que son extraíble en soluciones de álcalis ó insolubles en agua (Gruppen, Karmelink y Voragen, 1993; Ordaz-Ortiz y Saulnier 2005). Estos últimos pertenecerían a la fracción A de Hemicelulosas que se incluyen como fibra dietética insoluble.

Figura 2. Arabinoxilano



Fuente: www.adisseo.biz/Rovabioguide

El endospermo del grano de trigo contiene un 25% de arabinoxilanos solubles en agua (AX-SA). Estos AX-SA tienen estructura variable, se caracterizan por tener 60-65% de xilosa no sustituida, 12-20% de xilosa monosustituida, y entre 5-30% de xilosa disustituida (Andersson y col. 1994; Delcour y col 1999; Izdorczyk y Bliaders 1995). En general el ratio arabinosa /xilosa tiene valores de 0.5-0.6, siendo los valores extremos de 0.31 y 1.06 (Dervilly y col. 2000; Dervilly-Pinel y col. 2001). El valor típico de los arabinoxilanos extraíbles en agua es de 0.6.

Una característica de estos compuestos es la presencia de ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico, y ferúlico) unidos a las cadenas de arabinosa mediante enlaces éster (figura 2).

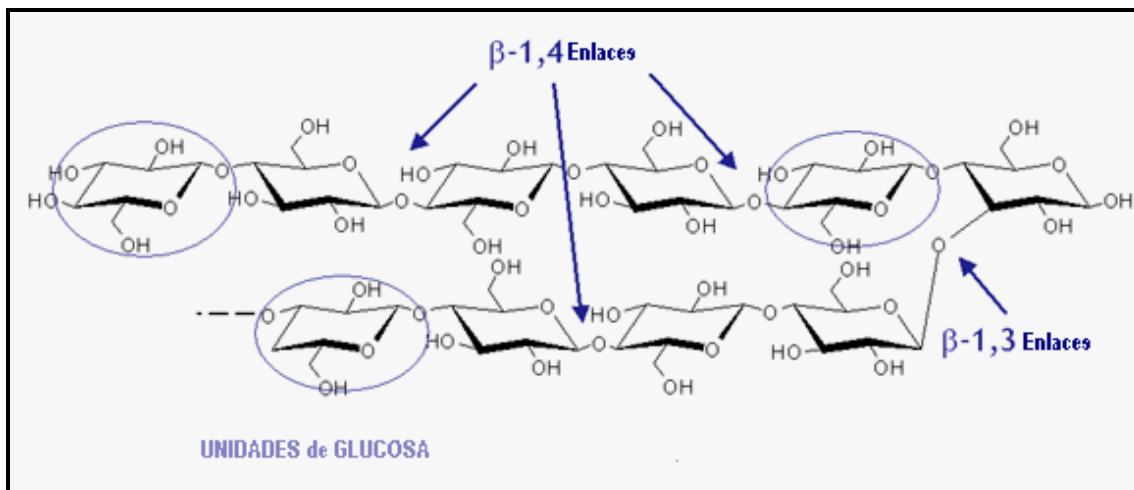
b) Xiloglucano. Principal hemicelulosa de las paredes celulares de las plantas dicotiledóneas. Tiene estructura similar a la celulosa, con un esqueleto de 0.15-1.5 μm de longitud, formado por 300-3000 glucosas unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ sustituido en C-6 con xilosa (Hilz, y col 2005); A su vez estas cadenas laterales de xilosa pueden tener enlazadas cadenas de galactosa, arabinosa o fucosa (Fry

1989). El endospermo del grano de arroz, presenta importantes concentraciones de xiloglucano (Maeda, Yamashita, Monta, 2006).

c) β -Glucanos. Polisacárido formado por una cadena lineal de glucosa (homopolisacáridos), unidas entre si por enlaces β (1 \rightarrow 4) y/o β (1 \rightarrow 3), en una relación aproximada de 2,3. Estos polisacáridos son particularmente abundantes en los cereales, aunque también se han detectado β -glucanos con enlaces β (1 \rightarrow 6) y/o β (1 \rightarrow 4) en hongos (*Phellinus linteus* o *Sparassis crispa*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (Soo Young Kim, Hong Ji Song, Yoon Young Lee*, yung-Hwan Cho*, Yong Kyun Roh, 2006).

Este polisacárido presenta una gran heterogenicidad basada en el grado de polimerización, con una masa molecular entre 5000-20 KDa. Su presencia es muy frecuente y en grandes concentraciones en gramíneas.

Figura 3. Glucano



Fuente: www.adisseo.biz/Rovabioguide

2. Sustancias pécticas ó pectinas.

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos (galacturonanos) y neutros (arabinogalactanos) muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de las células de origen vegetal (Zarra y Revilla, 1993)

La pectina de las frutas y legumbres contribuye a aumentar la viscosidad del bolo alimenticio, lo que influye en la asimilación de los nutrientes en la sangre y la colesterolemia. En el intestino grueso, las

pectinas son completamente fermentadas y transformadas esencialmente en acetato. Estos acetatos entran en el ciclo enterohepático, de manera que las pectinas aportan una cantidad no despreciable de energía. En promedio, el organismo humano absorbe alrededor de 2 kcal por cada gramo de fibras alimentarias consumido.

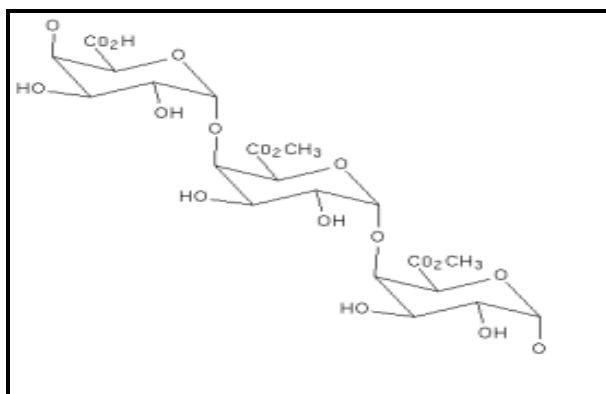
Las pectinas están compuestas de al menos 17 monosacáridos diferentes; estos monosacáridos se organizan en diferentes polisacáridos, que juntos forman la denominada red de pectinas (Visser y Voragen, 1996; Voragen y col. 2003 ; Vincken y col, 2003; Yapo, Lerouge, Thibault y Ralet 2007). Las sustancias pécticas más estudiadas (Ridley y col. 2000, Rodríguez-Carvajal, 2003), son los denominados galacturonanos.

a) Los galacturonanos consisten en un esqueleto de ácido galacturónico unidos entre si por enlaces α -(1-4). Dependiendo de la cantidad y el tipo de sustituciones de esta cadena, podemos distinguir diversos tipos de galacturonanos. Los más estudiados son homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano tipo I y tipo II (RGI Y RG II) y xilogalacturonano (XG)

Realmente en la pared celular es casi imposible distinguirlos puesto que suelen estar unidos entre si para formar una red péctica; De hecho la longitud de HG y la proporción de RGI, RGII y del propio HG influyen de manera crítica en las propiedades de las pectinas.

Los *homogalacturonanos* (HG), también conocidos como fracción, zona ó dominio liso de las pectinas, están formados por ácido galacturónico unidos entre si por enlaces α -(1-4). Sin embargo la unidad de repetición no es el monómero del ácido, sino el dímero (figura 4). La esterificación parcial por metanol sobre la función carboxílica (C-6) ó del ácido acético (posiciones O-2, O-3) crea heterogeneidad en la molécula, que va a influir de manera determinante en sus propiedades.

Figura 4. Homogalacturonano



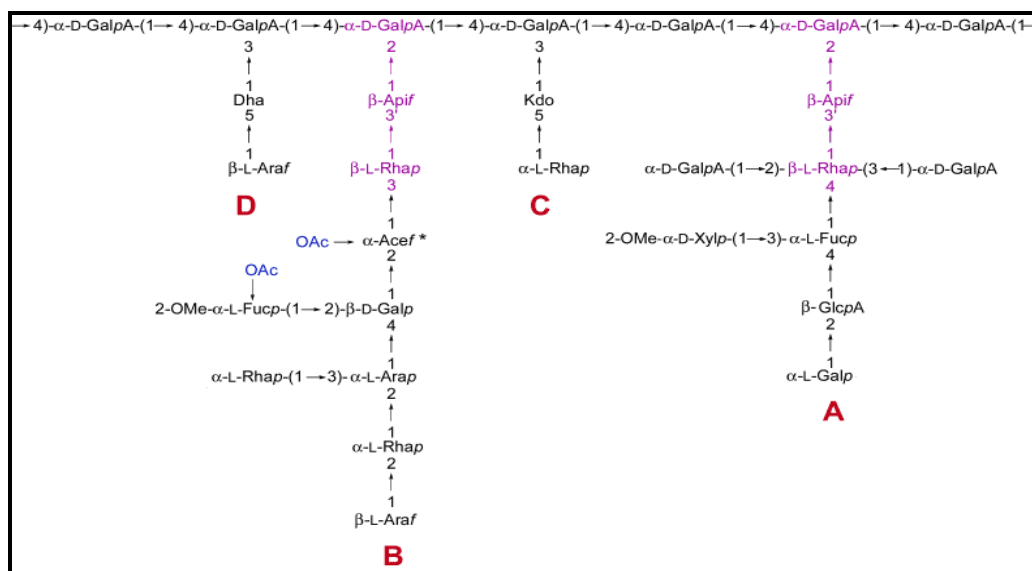
Fuente: www.ccrcc.uga.edu

No sólo es importante el grado de metilación (alto metoxilo o bajo metoxilo), si no también la distribución de los grupos metilo; bloques de más de 10 ácidos galacturónicos no esterificados son más sensibles a acomplejar iones calcio y formar geles, muy útiles en la industria alimentaria.

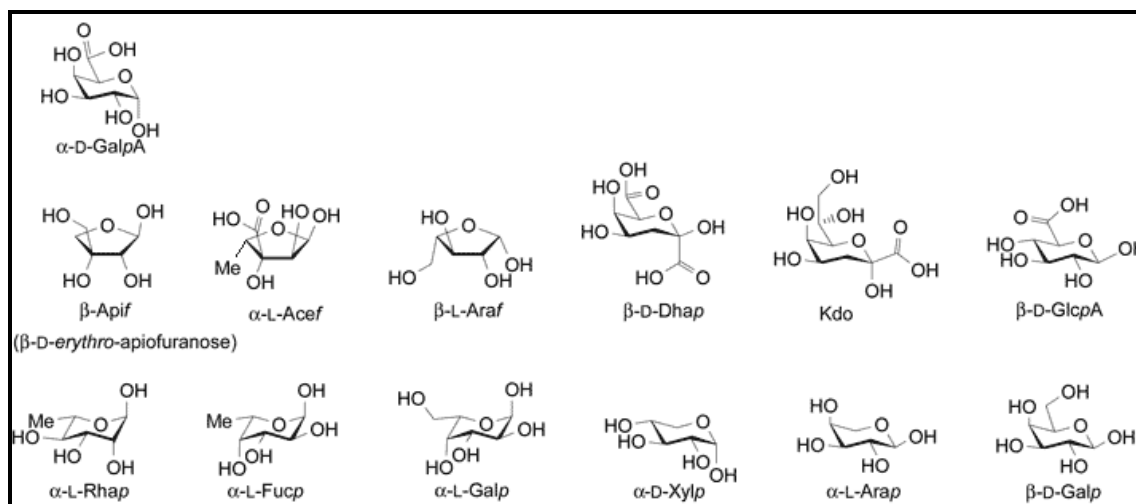
Los ramnagalacturonanos tipo I (RG I) y tipo II (RGII) constituyen las denominadas zonas pilosas ó erizadas de las pectinas, y junto con el HG, forman la red péctica. El tipo de uniones entre ambas zonas (lisa y pilosa), aun no está completamente establecido. Recientemente se ha sugerido que HG y RGII son cadenas laterales de RGI (Vincken y col. 2003), otros estudios por otro lado postulan incluso que RGII se encuentra embebido en la cadena de HG (Ishii y Matsuaga, 2001.).

El RGII es un polisacárido de bajo peso molecular (5-10 KDa, dependiendo si se encuentra formando dímeros), formado por un esqueleto de 8-10 unidades de ácido galacturónico, unidos por enlaces α -(1-4), con 4 cadenas laterales formadas por 12 azúcares diferentes (figura 5 a y 5b) entre los que se encuentran desde azúcares comunes como D-galactosa, L-arabinosa hasta los denominados “azúcares raros” como 2-O-metilfucosa, 2-O-metilxilosa, así como la pentosa, apiosa y algunas cadenas de azúcares ácidos ramificados como el 3-C-carboxi-5-deoxi-L-xilosa (ácido acérico) y ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo), ácido 3-deoxi-D-lixo-heptolosárico (Dha) (Hilz y col 2005). Estos últimos, más extraños, suelen estar en cadenas cortas de no más de tres residuos. El RGII puede formar dímeros a través de enlaces éster entre las cadenas laterales de apiosa y boro (micronutriente esencial en crecimiento de las plantas), aunque también puede formar complejos de coordinación con otros cationes específicos (Pellerin y col. 1997).

Figura 5 a. Ramnagalacturonano II



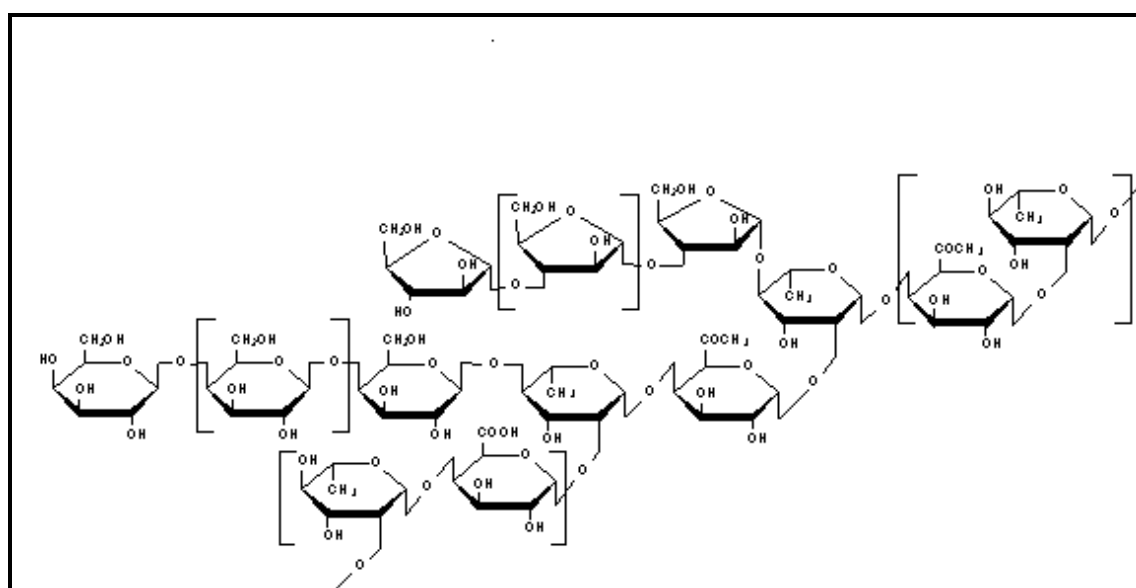
Fuente: www.ccrcc.uga.edu

Figura5 b. Azúcares que forman las cadenas laterales del ramnogalacturonano II

Fuente: www.ccrcc.uga.edu

Este polisacárido es resistente a la degradación por todos los enzimas pectolíticos conocidos, de tal modo que permanece en la forma no degradada en zumos de frutas, mostos y vinos.

La inserción de residuos de ramnosa entre los ácidos galacturónicos conforman el esqueleto ó eje central *del RGI* (figura 6) (Hilz y col 2005), un disacárido que se puede repetir hasta 100 veces. Aproximadamente la mitad de de los restos de ramnosa tienen sustituciones en C-4 con cadenas laterales de monosacaridos ó mas frecuentemente de arabinanos o arabinogalactanos tipo I y tipo II (pectinas neutras). De este modo su masa molecular puede alcanzar valores del orden de 200KDa.

Figura 6. Ramnogalacturonano I

Fuente: www.cybercolloids.net

Los *arabinanos* se encuentran en las paredes celulares como cadenas laterales de los RGI. Su estructura es relativamente simple, están constituidos por restos de L-arabinosa, siendo el enlace mayoritario α -(1-5); a su vez algunos de estos restos pueden estar unidos en 2 y/o en 3 a otros restos de arabinosa. Pueden tener también unidos ácido ferúlico mediante enlace tipo éster.

b) Los arabinogalactanos tipo I y tipo II, son las denominadas pectinas neutras, y también aparecen como cadenas laterales del RGI. Los arabinogalactanos tipo I (AG I), son muy abundantes en las pectinas de ciertas frutas como la manzana. Se caracterizan por una cadena principal lineal de galactosa unidas por enlaces β (1-4), con sustituciones de arabinano en posición 3.

Los arabinogalactanos tipo II son los polisacáridos pécticos neutros más abundantes y aunque posee una estructura similar al AGI, sin embargo, suele estar asociado con proteínas, formando arabinogalactanoproteínas (AGP). AG II está formado por un esqueleto de galactosa unidos por enlaces β (1-3), con cadenas laterales de α -L-arabinosa-(1-6)-(β -D-galactosa(1-6))_n (n=1,2 o 3)(Vincken y col. 2003).

Los AGP son proteoglicanos formados por la unión covalente entre un AG y un péptido rico en determinados aminoácidos. En general el 90 % de la molécula está formada por arabinogalactano y el 10% por proteína. Esta proteína suele ser rica principalmente en prolina, hidroxiprolina, alanina o glicina .(Ooesterveld, Voragen y Schol, 2002) .

Los AGP están presentes de forma soluble en el seno de las paredes celulares y pueden ser fácilmente extraíbles; forman parte de gomas o exudados vegetales por lo que tienen múltiples aplicaciones en industria alimentaria

En el caso del xilogalacturonano. La sustitución en posición O-3 de los ácidos galacturónicos por residuos de xilosa (entre 25 -75%), conduce a la formación de dicho xilogalacturonano, que junto con RGI y RGII forma la zona erizada de las pectinas.

3. Gomas y Mucílagos.

Las gomas o exudados vegetales como la goma arábiga, gatti, karaya, tragacanto, son estructuras muy ramificadas que poseen gran cantidad de azúcares neutros, así como ácidos urónicos (Asp, 1987). En general son polisacáridos de elevado peso molecular con estructuras ramificadas muy variables, así podemos encontrar galactomananos (goma guar), y otras gomas obtenidas de algas (alginatos, carragenanos, agar).

➤ **Los galactomananos** se obtienen de los semillas de distintas leguminosas. Están formados por una cadena de manosas unidas entre sí por enlaces β -(1,4), en la mayoría de los casos con ramificaciones formadas por unidades de galactosa unidas a las manosas por un enlace β 1-6. Dependiendo del vegetal del que se extraigan, los galactomananos tienen distinto grado de ramificación, y esto influye de forma esencial sobre sus propiedades.

Las gomas obtenidas de algas son principalmente : alginatos , agar, carragenantos.

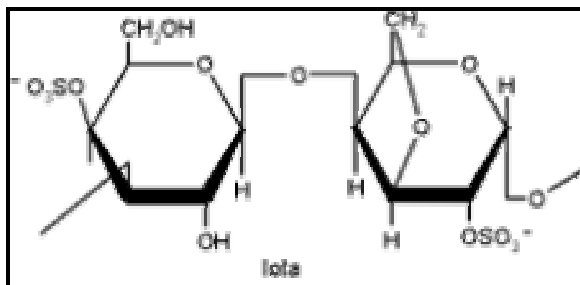
➤ Las algas sintetizan **el alginato** inicialmente como un polímero de ácido manurónico, que posteriormente modifican transformando unidades de manurónico en gulurónico mediante una epimerización enzimática. El producto final contiene zonas formadas por gulurónico, zonas formadas por manurónico y zonas con gulurónico y manurónico alternados. El alginato, en forma de sal sódica, potásica o magnésica, es soluble en soluciones acuosas a pH por encima de 3,5. También es soluble en mezclas de agua y solventes orgánicos miscibles con ella, como el alcohol, pero es insoluble en leche, por la presencia de calcio. La viscosidad de las soluciones de alginato depende de la concentración, elevándose mucho a partir del 2%, y de la temperatura, disminuyendo al aumentar ésta

➤ **El agar**, o agar -agar, es un polisacárido que se obtiene principalmente de algas del género *Gelidium*; en España se obtiene sobre todo de *Gelidium corneum*. En el listado de aditivos alimentarios de la Unión Europea, el agar es el E-406. El agar se considera formado por la mezcla de dos tipos de polisacáridos, la agarosa y la agarpectina. La agarosa es el componente principal, representando alrededor del 70% del total. Tanto la agarosa como la agarpectina tienen la misma estructura básica. El agar es un polisacárido no digerible, que desde el punto de vista nutricional forma parte de la "fibra". Las enzimas capaces de degradar el agar son extarordinariamente raras, incluso entre los microorganismos.

➤ **Los carragenatos** están formados por unidades de galactosa y/o de anhidrogallactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos α (1-3) y β (1-4)(figura 7). El peso molecular es normalmente de 300.000 a 400.000. La longitud de la cadena es importante, ya que por debajo de 100.000 de peso molecular, el carragenano no es útil como gelificante. Dependiendo del grado de sulfatación, de las posiciones de los grupos sulfato y de la presencia de grupos de anhidrogallactosa se distinguen varios tipos de carragenano, con propiedades como hidrocoloides claramente distintas. A mayor proporción de grupos sulfato, la solubilidad es mayor, y a mayor proporción de grupos de anhidrogallactosa la solubilidad es menor. Aunque existen alrededor de una docena de tipos, los más importantes son los carragenanos κ , ι , λ .

Del total de gomas que consumimos, la mayor parte procede de aditivos alimentarios (carragenanos, agar) ó bien son gomas sintéticas fabricadas a partir de materiales purificados.

Figura 7. Unidad de repetición de carragenato litta



Los mucílagos, son polímeros formados principalmente por ácido urónico. Tiene gran capacidad de retención de agua) son capaces de absorber entre 60-100 veces su peso en agua, y suele encontrarse en células especiales de la capa mas externa de ciertas semillas. (Asp, 1987).

Los mucílagos son estructuras muy complejas altamente ramificadas, formados por arabinosa, galactosa, ramnosa, xilosa, así como ácido galacturónico en diferentes proporciones.(Matsuhiro y col 2006)

Los mucílagos son análogos por su composición y sus propiedades a las gomas, dan con el agua disoluciones viscosas o se hinchan en ellas para formar una pseudodisolución gelatinosa. Se encuentran en semillas de lino, raíces de malva, membrillo, liquen, en ciertos hongos y en muchos vegetales.

I.3. INGESTA DE FIBRA DIETÉTICA. RECOMENDACIONES.

A pesar del intento de la Unión Europea de unificar criterios en cuanto a recomendaciones dietéticas, como es el consumo de fibra dietética; actualmente persisten las diferentes recomendaciones en los diversos países(tabla 3).

El proyecto EURODIET,(1998-2002), nació con el objetivo de intentar coordinar todos los programas europeos que promovían el binomio salud-nutrición (Lunn y Buttriss, 2007), de esta manera, se proponía un consumo mínimo de 25 gr/persona /dia. Por otra parte la OMS y otros códigos europeos contra cáncer y enfermedades cardiovasculares recomiendan de 30g/p/d, de la cual al menos un 30% debe ser FDS.

El consumo de fibra en España está por debajo de las recomendaciones dietéticas, con una ingesta de aproximadamente 18 g/p/d, de los cuales, tan solo alrededor de 6 gramos corresponden a la fracción soluble. De lo que se deduce que aunque la ingesta está por debajo de las recomendaciones nutricionales, se cumple el requerimiento de al menos un 30% de FDS (Saura-Calixto y Goñi, 2004).

Tabla 3. Recomendaciones de ingesta de fibra dietética en algunos países^a.

PAIS	RECOMENDACIÓN (g/p/d ^b)	TIPO DE FIBRA ^c
Dinamarca	25-30	AOAC
Francia	25-30	Fibra dietética sin especificar
Alemania	30	Fibra dietética sin especificar
Reino Unido	18	NSP (metodo Englyst)
España	30	AOAC
USA/ Canadá	Hombres(19-50 años):38	AOAC
	Hombres (mas de 50años):31	
	Mujeres (19-50 años):25	
	Mujeres (mas de 50 años): 21	
Australia/Nueva Zelanda	Hombres: 30	Fibra dietética sin especificar
	Mujeres: 25	
Japón	20-30	AOAC
Sudafrica	30-40	AOAC

^a Datos tomados de Lunn y Buttriss, 2007

^b Gramos/persona/día

^c Tipo de fibra según método empleado para determinarla.

Como veremos en el próximo apartado, el consumo de fibra soluble, en cantidades adecuadas y dentro de una dieta saludable, favorece la disminución de colesterol y glucosa en sangre y desarrolla la flora intestinal. Por ello es importante mantener una ingesta y balance adecuado FDS/FDI

I. 4. PRINCIPALES EFECTOS DE LA FIBRA SOLUBLE .

La FD puede encontrarse de manera natural en los alimentos o como ingrediente adicionado para mejorar sus propiedades nutricionales o propiedades funcionales y tecnologicas (agente gelificante).

Como se ha comentado, la manera más comun para clasificar la fibra es según su solubilidad en agua. Originariamente se pensó que esta división debería servir para predecir las funciones fisiológicas de la fibra. Sin embargo la relación FDS/FDI es importante no solo para propiedades dietéticas y efectos

en la salud, si no también para propiedades tecnológicas y uso como ingrediente funcional; concretamente está generalmente aceptado que las fibras mas adecuadas para su uso como ingrediente funcional son aquellas con una relación FDS/FDI de 1:2 (Schneeman, 1987).

Los efectos beneficiosos de la FD en la salud, van a depender de las propiedades funcionales y/o tecnológicas de esta fibra, por ejemplo la viscosidad y capacidad de intercambio iónico y captación de moléculas orgánicas son los principales contribuyentes a los efectos metabólicos (metabolismo glucídico y lipídico), que a su vez se relacionan con enfermedades cardiovasculares.

Así, podemos distinguir entre propiedades tecnológicas y propiedades nutricionales (que en última instancia van a depender en buena medida de las propiedades tecnológicas.

1. *Propiedades tecnológicas, fisico-químicas o funcionales.*

Estas propiedades son inherentes a la fibra dietética total, pero el grado depende de: proporción FDS/FDI, tamaño de partícula, alimento del que proceden.

Estas propiedades se pueden clasificar en:

- Capacidad de absorción y retención de agua.
- Viscosidad y capacidad para formar geles.
- Capacidad para fijar o captar moléculas orgánicas (como ácidos biliares).
- Capacidad de intercambio o captación de iones.
- Capacidad de fermentación.

Las propiedades de hidratación se caracterizan mediante la determinación de las denominada capacidad de retención de agua (WHC, WBC) y la capacidad de hinchamiento (SC).

SC se puede definir como el volumen ocupado por una cantidad conocida de fibra, mientras que la capacidad de retención da agua se definiría como la cantidad de agua retenida por una cantidad conocida de fibra (Robertson y col. 2000) Los componentes de la fibra que presentan mayor capacidad de hidratación son pectinas y hemicelulosas (FDS).

La FDS , o más concretamente los polisacáridos que la constituyen, tienen capacidad para formar disoluciones altamente viscosas. La viscosidad de estas disoluciones está determinada por la concentración, temperatura , pH, tamaño de partícula. De este modo la FDS debido a esta viscosidad

será capaz de ralentizar el paso del alimento por el intestino delgado, a la vez que dificultará la absorción de nutrientes.(Selvendran y col. 1987)

La fibra dietética puede unirse de manera reversible a gran numero de moléculas orgánicas, como sales biliares, sustancias esteroideas (colesterol), algunos compuestos que pueden ser tóxicos. La adsorción de compuestos orgánicos se ha observado tanto en fibras predominantemente solubles como en aquellas con mayor proporción de insoluble; esto apoya la afirmación de Kay (1982), indicando que este tipo de union reversible depende no solo de la relación FDS/FDI, si no también del pH, de la naturaleza química de la molécula orgánica. Esta propiedad está íntimamente relacionada con la excreción de sales biliares, metabolismo lipídico y del colesterol.

Las pectinas que forman parte de la fibra soluble tienen capacidad de retener o captar cationes metálicos, como Ca, Zinc, o hierro. No existen datos que aseguren que la fibra *per se*, afecte de manera negativa la biodisponibilidad de minerales, sin embargo parece ser que el ácido fítico, presente en cantidades significativas en cereales, es el constituyente con mayor capacidad para retener minerales(Torre, Rodríguez y Saura-Calixto, 1991)

En cuanto al grado o capacidad de fermentación de la fibra, es muy variable de unos componentes a otros, aunque realmente, el factor que más influye es la estructura química del compuesto. De esta manera, la FDS (pectinas, gomas) tiene mayor capacidad de fermentación que la FDI (celulosa) y que la lignina (no fermenta). Los productos finales de la fermentación son ácidos grasos de cadena corta (propiónico, acético, butírico), que no solo afectan al posterior metabolismo bacteriano, sino que pueden ser transportados a otros órganos del cuerpo donde ejercerán su acción afectando a diversos procesos fisiológicos.

2. Propiedades nutricionales y/o fisiológicas

Entre los efectos beneficiosos podemos destacar:

- Efectos sobre metabolismo lipídico , Diabetes y problemas cardiovasculares

Las propiedades de la FDS como viscosidad, capacidad de captar sales biliares, y quizá la capacidad de inhibir la síntesis de colesterol (inducida por los ácidos grasos de cadena corta producidas durante la fermentación), se cree que son las principales responsables de la disminución de colesterol en sangre (Wu y col. 2003).

Hace más de 20 años Jenkins y col. (1986) fueron capaces de describir cómo un aumento en la ingesta de fibra dietética soluble producía un retraso en la absorción de nutrientes al enlentecer el

tránsito intestinal y disminuir la interacción enzima-nutrientes. Esta disminución en la absorción de carbohidratos, así como la acción de los productos de fermentación se ha relacionado con la prevención y el tratamiento de la diabetes

La FDS produce reducción en colesterol serico total y en LDL, esto es provocado por que el colesterol total y de ácidos biliares que se absorbe desde el intestino delgado e íleon respectivamente, es menor. En el intestino delgado la fibra soluble, por la formación de soluciones viscosas, produce un aumento del espesor de la capa de agua que han de traspasar los solutos para alcanzar la membrana del enterocito, lo que provoca una disminución en la absorción de glucosa, lípidos. Asimismo, se producirá una disminución en la absorción de los ácidos biliares ya que estos se unen a los residuos fenólicos y urónicos en la matriz de los polisacáridos. Esto puede alterar la formación de micelas y la absorción de las grasas. Como consecuencia de la depleción de ácidos biliares pueden disminuir los niveles de colesterol, al utilizarse éste para sintetizar más ácidos biliares (Queenan y col. 2007; Glore y col. 1994).

También hay evidencias de que el ácido propiónico producido durante la fermentación de la fibra puede inhibir la producción de colesterol en el hígado

De este modo un aumento en la ingesta de FD particularmente soluble, mejora el control de la glucemia y disminuye la concentración plasmática de lípidos, lo que confiere perfil idóneo de protección cardiovascular.

Los mecanismos propuestos para explicar los beneficios de la fibra en enfermedades cardiovasculares estarían en relación con la capacidad de limitar la absorción del colesterol intestinal y con la acción quelante sobre las sales biliares. Asimismo, se ha visto que el propionato, tras ser absorbido desde el colon a la circulación portal, puede actuar inhibiendo la HMG-CoA reductasa, disminuyendo así la síntesis endógena de colesterol.

Por otra parte en los últimos treinta años múltiples estudios han demostrado que la administración de fibra dietética podía reducir los niveles de glucemia en pacientes con diabetes tanto tipo 1 como tipo 2 (Butt y col 2007, Schroder, 2007)).

El papel de la fibra sobre la disminución de riesgo de padecer diabetes tipo 2, esta relacionado en primer lugar con la viscosidad de la fibra. Las fibras viscosas reducen respuesta glicérica mejor que fibras que carecen de esta propiedad (fibra insoluble). Es decir, parece que la fracción soluble es la más eficaz en el control de la glucemia. Los mecanismos que se proponen son (Wu y col. 2003):

- Retraso en el vaciamiento gástrico. Aumento de la viscosidad enlentece este vaciamiento.

- Disminución en la absorción de glucosa al quedar atrapada por la viscosidad de la fibra y ser entonces menos accesible a la acción de la amilasa pancreática.

- Producción de AGCC: el propionato influiría en la neoglucogénesis reduciendo la producción hepática de glucosa. El butirato podría actuar reduciendo la resistencia periférica a la insulina al reducir la producción de TNF α . Como es bien sabido, la resistencia a la insulina es uno de los factores más importantes implicados en el síndrome metabólico. Es importante también tener en cuenta que la insulina tiene, además de su acción metabólica, un efecto sobre el endotelio vascular que facilita la progresión de la aterogénesis

➤ Fibra y salud gastrointestinal.

El consumo de fibra mejora el estreñimiento leve y moderado, debido al incremento de la masa fecal. Esto es así tanto con la fibra soluble como con la insoluble (Bosaeus, 2004).

La fibra soluble, y en general fermentable, aumenta la biomasa bacteriana y la retención de agua. Las sales biliares y los ácidos grasos de cadena corta (generados en la fermentación) también estimulan la motilidad y aceleran el tiempo de tránsito intestinal.

Los gases producidos en la fermentación aumentan la masa fecal al quedar atrapados en el contenido intestinal.

Por otra parte también tiene efectos beneficiosos en casos de diarrea (Bosaeus, 2004). La fibra altamente fermentable (como la Fibra soluble), produce una gran cantidad de ácidos grasos que al ser absorbidos arrastran consigo también sodio y agua (se absorben de igual manera). En cualquier caso este efecto de la fibra aún necesita ser investigado más en profundidad, puesto que tan solo existen estudios verdaderamente documentados en nutrición enteral (Bosaeus, 2004)

La enfermedad diverticular es muy frecuente en los países occidentales y esto se ha asociado con una baja ingestión de fibra, por lo que un aumento en la ingesta de fibra dietética contribuiría a disminuir su incidencia (Cunningham y Marcason, 2002; Aldoori y Ryan- Harshman, 2002). Cuando existe un residuo insuficiente, el colon responde con la generación de contracciones más fuertes para poder propulsar distalmente el pequeño volumen de contenido intestinal. La fibra ayudaría a disminuir la presión intraluminal del colon, evitando la formación sacular a través de la pared intestinal.

➤ Fibra y efectos sobre diversos tipos de cáncer.

Burkitt (1988, 1991) describió una asociación inversa entre el consumo de fibra y el riesgo de cáncer de colon al comparar los patrones de alimentación en Inglaterra y África oriental. Desde esa época se han realizado múltiples estudios con resultados a veces contradictorios

El European Propective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) (Bingham y col, 2003), estudio de ámbito mundial que incluyó casi 520.000 personas con un seguimiento durante seis años, relacionó inversamente la toma de fibra en dosis alta con la incidencia de cáncer de intestino grueso, donde el mayor efecto correspondía al colon izquierdo y el menor al recto.

Una elevada ingesta de fibra dietética se asocia con un menor riesgo de cáncer colon-rectal, no obstante esta asociación puede producirse de una manera no directa; inicialmente se consideró que los efectos sobre el bolo fecal y la velocidad de tránsito intestinal que provocaba la fibra, podían ser la causa de su beneficio, sin embargo, existen cada vez más pruebas de que los AGCC y en especial el butirato, son los que pueden tener una función protectora por sus efectos sobre la proliferación celular, la apoptosis y la expresión genética; del mismo modo el hecho de que disminuya el pH del colon durante la fermentación inhibe la actividad del enzima 7- α -hidroxilasa que convierte los ácidos biliares primarios en secundarios, considerados procarcinógenos.

Por otra parte, el rápido movimiento de las sustancias a través del intestino, provocado por la fibra dietética reduce el tiempo de contacto de los posibles agentes cancerígenos con las paredes intestinales.

Cabe destacar el número creciente de estudios que se centran en la relación entre el consumo de FD (principalmente derivada de cereales) e incidencia de cáncer de mama (Gerber, 1998). Existen muchas y variadas hipótesis que apoyan estos estudios. La fibra puede reducir la concentración de estrógenos en la circulación enterohepática al "atrapar" los estrógenos deconjugados, evitando de esta manera su absorción (Gorbach y Goldin 1987); aunque también se puede pensar (Larson y col. 1996) que una elevada ingesta de FD esta inversamente relacionada con la grasa total, la cantidad de tejido adiposo intraabdominal y tejido adiposo subcutáneo (estudio realizado por Larson y col en 1996 en 135 hombres y 214 mujeres), de tal modo que al disminuir las reservas grasas y /o adiposas, se disminuya la síntesis de estrógenos.

En general, aunque en la literatura principalmente se relacione la ingesta de FD con prevención de cancer de colon y cancer de mama, cada vez aparecen mas trabajos centrados en demostrar la relación entre la ingesta de FD y la disminución del riesgo de padecer otro tipo de cánceres, como cáncer de ovario (McCann y col. 2001).

I.5. PRINCIPALES COMPUESTOS ASOCIADOS A FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE.

1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos o polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas (ruta metabólica del shikimato o la ruta del acetato). Se han descrito más de 8000 estructuras fenólicas en el reino vegetal (Bravo , 1998), que pueden dividirse en al menos 10 clases diferentes atendiendo a su estructura química

La principal fuente dietética y diaria de polifenoles son frutas y bebidas, seguidas por alimentos hortalizas, legumbres y cereales. Diversos estudios han sugerido (Ito y col , 2005; Manach y col. 2004; Scalbert y Mananch, 2005) la relación entre el consumo de alimentos o bebidas ricos en compuestos fenólicos y protección frente a diversas enfermedades (Scalbert y Williamson, 2000; Renaud y De Lorgeril, 1992; Estruch y col.2004; Szmitko y Verma, 2005; Shankar, y col. 2007; Sun y col 2006; Nishio y col., 2007; Heald y col. 2007; Omoni y Aluko, 2005).

Las propiedades biológicas de los compuestos polifenólicos dependen de la biodisponibilidad de éstos, que en última instancia depende de la estructura química y de la forma en se encuentre en alimento (Borges y col. 2007; Karakaya, 2004;Bravo, 1998).

En la pared celular de los vegetales, los fenoles alcanzan al menos el 5% s.s. de la planta, estando principalmente asociados con polisacáridos de tipo hemicelulósico. La aparición de polifenoles unidos y/o retenidos en la pared vegetal dependen de diferentes factores: estereoquímica, flexibilidad conformacional, tamaño molecular o porcentaje de “galoilación” de la molécula fenólica (Pinelo , 2006).

Hasta la fecha se han propuesto dos hipótesis para explicar la formación del complejo Polisacárido-polifenol, la primera postula la existencia de enlaces hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los fenoles y los átomos de oxígeno presentes en los polisacáridos entrelazados en la pared celular (Freitas, y col. 2003; Le Bourvellec y col. 2005), mientras que la segunda hipótesis se basa en la existencia de interacciones hidrofóbicas. Diversos estudios (Ficarra y col. 2002; Le Bourvellec y col. 2005) han demostrado la formación de cavidades hidrofóbicas en la pared celular que son capaces de albergar , “encapsular” ó acomplejar compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar teniendo en cuenta su solubilidad en extractables y no extractables (Bravo, 1999, Scalbert y col. 2006; Manach y col. 2004), o teniendo en cuenta la manera en que se encuentren en los alimentos, podemos hablar de polifenoles asociados o no a la matriz de la fibra. Los compuestos fenólicos extractables son aquellos de medio y bajo peso molecular fácilmente extraíbles empleando diferentes solventes acuoso-orgánicos, mientras que los no extractables son taninos condensados de elevado tamaño molecular y otros compuestos fenólicos que se

encuentran unidos a otros componentes de la matriz alimentaria (proteína o polisacáridos de la pared celular), que permanecen insolubles en las disoluciones empleadas habitualmente en su extracción. Como veremos más adelante en el caso de las bebidas se trataría realmente de compuestos fenólicos solubles no extractables (debido a su unión con la fibra dietética soluble) (Bravo, y col. 1994)

Los compuestos fenólicos son un complejo grupo de sustancias con diferentes tamaños moleculares que pueden encontrarse libres ó asociadas a fibra dietética ó proteína. Los fenoles asociados a la fibra son taninos, proantocianidinas, así como taninos hidrolizables y otros fenoles. Diversos autores (Kroon y Williamson, 1997; Kern y col 2003; Andreassen y col. 2000; Garcia-Conesa y col. 1997) han demostrado cómo el ácido férulico es capaz de formar enlaces tipo éster con las cadenas laterales de los polisacáridos pécticos.

Los ácidos hidroxicinámicos generalmente se encuentran unidos a polisacáridos de paredes celulares (arabinosilanos, xiloglucanos, pectinas) a través de enlaces tipo éster (Kroon y Williamson, 1998), del mismo modo, estos ácidos pueden unirse a glicoproteínas de las paredes celulares a través de residuos de tirosina ó cisteína (Bacic y Stone, 1996).

Estos compuestos fenólicos que se encuentran unidos a proteínas y polisacáridos de paredes celulares son compuestos considerados altamente indigeribles ya que resisten la digestión (hidrólisis) enzimática realizada por enzimas amilolíticas y proteolíticas empleadas en los métodos usuales de análisis de fibra dietética (Saura-Calixto y Bravo, 2001).

La unión de cantidades significativas de compuestos fenólicos a la fibra dietética aporta importantes propiedades en nutrición y salud a dicha fibra. En los últimos años nuestro grupo ha desarrollado diversos estudios e investigaciones en fibras ricas en polifenoles asociados, obteniendo y aislando fibra antioxidante (Larrauri, y col. 1997; Larrauri y col 1996; Saura-Calixto 1998); generando el concepto de fibra dietética antioxidante, cuyos potenciales efectos in vivo dependerán de la biodisponibilidad de estos polifenoles.

2. Proteínas.

Para la mayoría de las proteínas estructurales de la pared vegetal, se ha definido una estructura fibrilar y que se inmovilizan mediante enlace covalente entre ellas o con carbohidratos, que pueden formar parte de la fibra dietética.

Las proteínas asociadas con la fibra dietética, suelen ser proteínas estructurales de la pared celular vegetal que pueden ser proteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), en prolina (PRPs), ó ricas en serina.

La glicoproteína mas estudiada, que sabe forma parte de la fibra soluble es el grupo de las arabinogalctanoproteínas (AGPs), polisacárido que se encuentra principalmente formando parte de las pectinas.

En las AGPs la arabinosa se encuentra principalmente unida a la hidroxiprolina, mientras que los residuos de la galactosa normalmente se unen la serina (como ya describieron Clarke y col en 1979), aunque tambien pueden darse enlaces con otros monosacáridos, galactosa, glucosa

O'Neill y Selvendran (1980), han demostrado la presencia de diferentes fracciones de glicoproteínas (una rica en hidroxiprolina y otra con un contenido bastante más bajo).en la pared celular del Phaseolus coccineus, aunque ambas fracciones contenian glucosa, xilosa, ramnosa acidos urónicos, además de la galactosa y arabinosa.

Las propiedades emulsificantes de la Goma arabica estan relacionadas con la presencia de pequeñas cantidades de proteína unida covalentemente a la estructura polisacáridica. Esto sugiere que los AGP tiene un papel predominante en propiedades emulsificantes (Al Assaf, y col. 2003; Al Assaf, y col. , 2005),estas mismas propiedades han sido detectadas en relación con los polisacáridos solubles de la soja (Nakamura y col. 2006).

Existen otro tipo de proteínas con habilidad para unirse a carbohidratos, como lectina y arcelina (Sathe y col. 2005; Nangia-Makker y col. 2002), ambas glicoproteínas presentes en legumbres. En el cacahuete (*Arachis hypogaea*) existe una lectina, tetramérica, como la de la alubia roja, que es capaz de reconocer unidades de beta-D-galactosa. También son abundantes en lentejas, guisantes, soja y trigo germinado. Pero sin embargo no existen evidencias ni estudios sobre la presencia de estas proteínas asociadas a la FD.

3. Otros Compuestos.

Existen otros compuestos que pueden encontrarse asociados de diversas maneras a la fibra dietética, como pueden ser:

Compuestos de Maillard. Las diversas y complejas reacciones entre azúcares reductores y proteínas, péptidos, aminoácidos o aminas, así como, las numerosas siguientes y consecutivas

reacciones, se engloban dentro de las denominadas reacciones de Maillard.

La primera reacción se conoce como condensación de Maillard, en la que los sustratos que intervienen principalmente son azúcares reductores, carbonilos (provenientes de la oxidación de las grasas) y también algunas vitaminas así como grupos aminos de los aminoácidos.. En esta primera fase se forma una glicosilamina. A continuación se puede producir la reorganización de Amadori en la que la glicosilamina por reorganización va lugar a una cetosamina. Esta cetosamina puede sufrir una descomposición generándose alfa-dicarbonilos, di carbonilos insaturados reductores que son compuestos muy reactivos y dan lugar a complejos de alto peso molecular y que ya confieren colores pardos, denominados *melanoidinas* que influyen en el color, olor, aroma y sabor del alimento. Finalmente puede ocurrir que estas melanoidinas sufran el proceso denominado degradación de Strecker, en el que se generan aldehidos de Strecker que son compuestos con bajo peso molecular que se detectan fácilmente por el olfato.(Bunko y Kennedy, 2007)

En consecuencia, los compuestos principales, las melanoidinas, son el resultado de la formación de enlaces entre los grupos amino de las proteínas y grupos carbonilo de los azúcares reductores. Se forman durante tratamientos térmicos a los que somete el alimento, como el tostado de la cebada en la elaboración de cerveza o el tostado del grano de café previo a la molienda.

En conclusión, las reacciones de Maillard son consideradas de gran interés porque producen compuestos que exhiben propiedades antioxidantes particularmente en sistemas lipídicos. (Rufian-Henares y Morales, 2007)

Los Minerales. Los minerales asociados a la fibra más estudiados incluyen, hierro, zinc, y calcio. El efecto de esta interacción depende del tipo de fibra. Concretamente en sustancias pécticas se pueden encontrar atrapados iones, como el Calcio. La fibra dietética tiene capacidad para enlazar, retener ó incluso intercambiar cationes metálicos. Esta propiedad presenta gran importancia desde un punto de vista fisiológico ya que está intimamente relacionado con el comportamiento de la fibra. Los productos vegetales generalmente contienen un número elevado de elementos inorgánicos, cuyo contenido varía. Estos elementos estan asociados a diferentes componentes de la fibra, por ejemplo, el calcio está asociado a pectinas(las pectinas de bajo metoxilo, requieren de cationes divalentes (Ca^{2+}) en su estructura para formar geles.) y hemicelulosas, hierro y zinc están asociados a ambas fracciones, mientras que el fósforo y el magnesio se encuentran unidos principalmente a la fibra soluble. Por este motivo un aumento en la ingesta de fibra alimentaria llevaría consigo un aumento en el consumo de minerales esenciales, sin embargo la posible utilización de estos elementos por el organismo puede verse reducida por la fuerte retención de los cationes en (Torre y col. 1991a; Torre, y col.1991b)

METODOLOGIA

I. ANÁLISIS DE FIBRA. ANTECEDENTES

El primer método que se empleó para determinar fibra (fibra bruta), es el conocido como método Weende, desarrollado por Henneberg y Stohmann (1860) y denominado así por haberse desarrollado en la estación experimental del mismo nombre, en Gottinguer, Alemania. Este método se desarrolló en un principio para la determinación de material indigestible en piensos y demás sustancias destinadas a alimentación animal; es un método químico que consiste en una extracción secuencial con ácido diluido y álcali, y posterior del residuo insoluble por filtración que se cuantificará gravimetricamente como fibra. Aunque se utilizó como un primer acercamiento a la determinación de fibra, demostró tener una gran variedad de defectos, por lo que en la actualidad la AOAC lo ha relegado a un uso exclusivo en alimentación animal.

Más tarde, Van Kamer (1949), propuso aislar la fibra empleando ácido tricloroacético, ácido acético y ácido nítrico para digerir la muestra. Sin embargo estos ácidos no conseguían la adecuada digestión de la celulosa.

Desde que surgió el concepto de fibra dietética (Hipsley, 1953), se han propuesto, diversos métodos para su determinación (Van Soest y McQueen, 1973; Southgate, 1981, Theander y Aman, 1979, Prosky y col, 1988, Prosky y col., 1992; Englyst y Cummings, 1988). Estos métodos en general se agrupan en: métodos químicos y métodos enzimáticos (enzimático-gravimétrico y enzimático-químico)

1. Métodos químicos. Este tipo de métodos se basan en el empleo de diversos reactivos químicos (ver capítulo anterior) y actualmente no se emplean en el ámbito de la nutrición humana. De los diversos métodos químicos desarrollados y que aún se emplean en alimentación animal (Arthington y Brown 2005; Yan y Agnew 2004, Weiss y Wyatt 2002, Harlan, y col. 1991), son los métodos detergente ácido y detergente neutro (Van Soest y McQueen, 1973). Estos métodos tuvieron una gran aceptación para realizar determinaciones de fibra que se necesitaran con rapidez, en una época en la que las determinaciones vía enzimática estaban en una fase inicial; incluso en 1975 fue asumido por la AOAC como método oficial.

Van Soest desarrolló los métodos denominados detergente ácido y detergente neutro. Ambos métodos son complementarios, el primero utiliza bromuro de hexadeciltrimetilamonio ácido para solubilizar todos los componentes excepto celulosa, lignina y cenizas; mientras el método del detergente neutro emplea dodecilsulfato de sodio para solubilizar todos los compuestos diferentes de la celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas. En consecuencia, la celulosa se cuantifica oxidando con permanganato potásico la lignina obtenida en el método ácido y las hemicelulosas se determinan por diferencia entre ambos métodos (Van Soest y McQueen 1973).

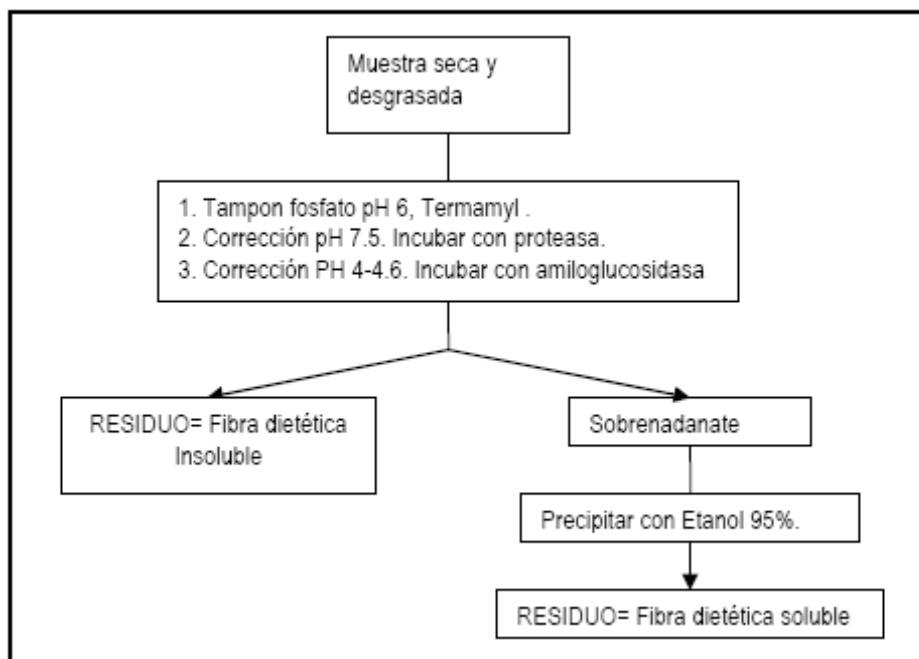
Sin embargo la aplicación de estos métodos detergentes, y químicos en general, presentaban serios problemas cuando se empleaban para determinar fibra en vegetales destinados a alimentación humana (especialmente el método de detergente ácido); los principales problemas derivaban fundamentalmente de la presencia de elevadas concentraciones de almidón, posible precipitación de ácidos orgánicos que pueden falsear los resultados), así como diversos errores en la cuantificación de hemicelulosas, además de no cuantificar adecuadamente la fibra soluble (Van Soest y McQueen, 1973).

Por otra parte la correlación de la fibra cuantificada por estos procedimientos con el contenido de polisacáridos indigeribles de los alimentos era muy baja, por ello se sustituyeron por los denominados genéricamente métodos enzimáticos.:

2. Métodos enzimático gravimétricos (MEG). Estos métodos determinan polisacáridos indigeribles menos almidón, pero incluye lignina. Determinan la fibra como el residuo que permanece tras el tratamiento con enzimas que degradan almidón y proteína (Asp y col, 1983; Schweizer y Wüsch, 1979).

A los primeros intentos de empleo de enzimas, llevados a cabo por Williams y Olmsted en 1935, se unieron importantes avances surgidos al desarrollar nuevas técnicas que separaban fibra soluble e insoluble mediante precipitación con etanol (Furda 1977; Furda, 1981; Schweizer y Wüsch, 1979; Schweizer y Wüsch, 1981; Asp y Johanson 1981). Sin embargo, estos métodos han sufrido cambios encaminados a favorecer su estandarización y simplificar su aplicación, de esta manera se emplearía un solo tratamiento enzimático con amiloglucosidasa (Li, 1995, Li y Zhao, 1997) o mediante el tratamiento con diversas mezclas enzimáticas (Cranker, Philips, Gonzales y Stewart, 1997). Sin embargo, tras muchas variaciones y desarrollo de métodos, en la actualidad, el método más empleado de los incluidos en este grupo, que por otra parte está reconocido como oficial por la A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) es el conocido como método de Prosky (Prosky y col. 1988; Prosky y col. 1992), que cuantifica la fibra de manera gravimétrica y considera la fibra dietética como polisacáridos no digeribles más lignina (Mañas y Saura-Calixto, 1995). Este método surgió como resultado de un estudio conjunto de los métodos enzimático-gravimétricos existentes hasta el momento.

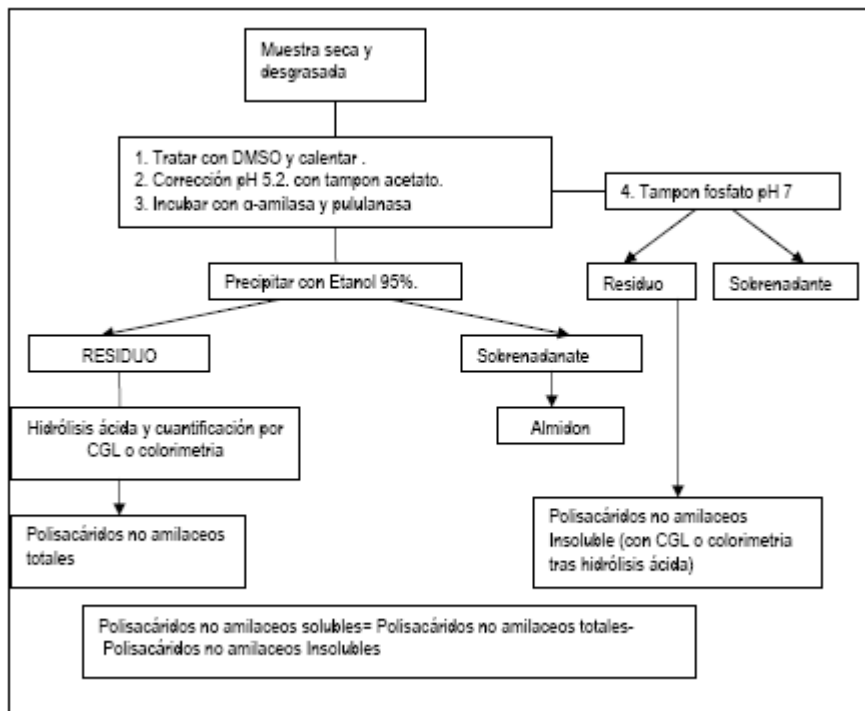
En este método Prosky, mantiene la gelatinización inicial con Termamyl, pero emplea proteasa y amiloglucosidasa en lugar de pepsina y pancreatina (Asp y col. 1983), reduciendo de este modo los tiempos de incubación. Este procedimiento permite cuantificar las dos fracciones de fibra gravimétricamente (figura 1); en ambos casos en el residuo de fibra obtenido debe sustraerse el contenido de proteína y cenizas.

Figura 1. Principales pasos del método propuesto por Prosky (Prosky y col. 1992).

3. Métodos enzimático-Químicos (MEQ). Mediante estos métodos se cuantifica la fibra dietética como la suma de los diferentes constituyentes aislados. Son métodos de fraccionamiento que difieren ciertos aspectos experimentales pero todos comparten el mismo principio, separación de polisacáridos no celulosicos e hidrólisis para determinar pentosas y hexosas. Tras el tratamiento enzimático, la determinación se realiza químicamente tras una hidrólisis ácida.

Multitud de autores han desarrollado variaciones de estos metodos enzimático-quimico, aunque todos con la misma base metodologica química (Southgate, 1969; Theander y Westerlung, 1986; Theander, y Aman, 1990) . El método desarrollado por Englyst y Cummings (1988), es en la actualidad el método considerado oficial en el Reino Unido.

El método de Englyst y Cummings (1988), basa en el método de Southgate (Southgate, 1969), pero sustituyendo los métodos colorimétricos por métodos cromatográficos; este método determina fibra soluble e insoluble como polisacáridos no amilaceos, gelatinizando el almidón y separándolo por digestión enzimática (figura 2). Asi mismo, el método de Englyst presenta la característica de no incluir la lignina en el análisis de fibra (considera fibra alimentaria todos los polisacáridos excepto el almidón).

Figura 2. Principales pasos del método propuesto por Engyst y Cummings (1988).

A pesar de la gran cantidad de métodos desarrollados para la determinación de fibra dietética, todos ellos adolecen de diversas fuentes de error que en la mayoría de los casos son comunes. Se han realizado diversos estudios comparando los distintos métodos entre sí (Mongeau y Brassard, 1990; Wolters y col. 1992), pero sólo algunos de ellos muestran claramente las posibles fuentes de error de los métodos existentes para la determinación de fibra (Saura-Calixto, 1988; Mañas y col. 1990; Saura-Calixto y col. 1991; Mañas 1992; Mañas y Saura-Calixto, 1995). Estos errores, afectan tanto a la fracción soluble de la fibra como a la fracción insoluble y se pueden resumir en:

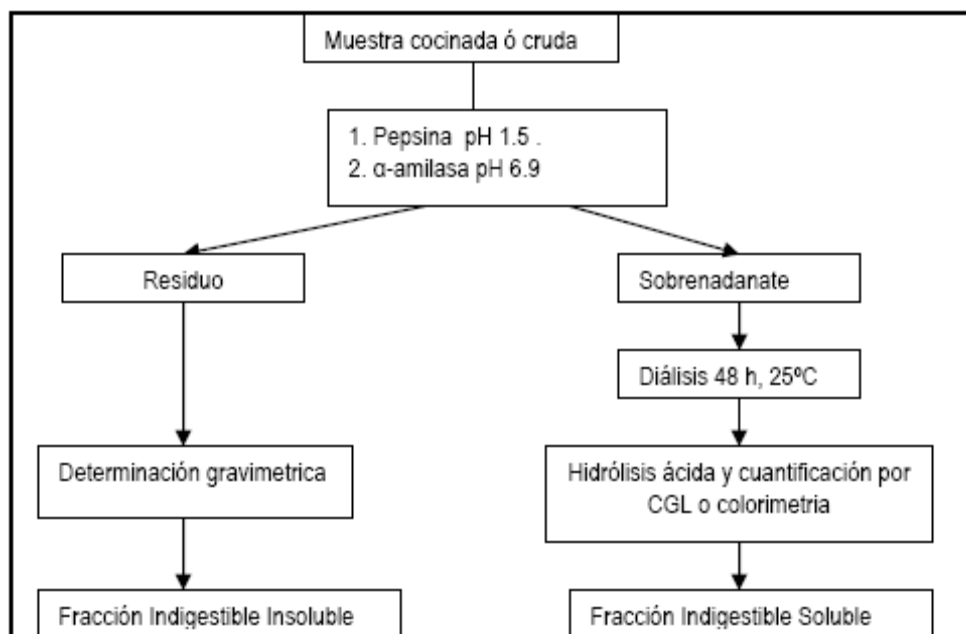
1. Errores debidos a la determinación gravimétrica de la fibra dietética soluble por precipitación etanólica. Con este método se puede provocar la co-precipitación de otros compuestos que no forman parte de la fibra dietética soluble y por otra parte la precipitación incompleta de los constituyentes de la fibra dietética soluble (Mañas y Saura-Calixto, 1993).
2. Las correcciones con cenizas y proteínas en los residuos gravimétricos junto con compuestos asociados son causa de error cualitativo y cuantitativo muy importantes a la hora de cuantificar gravimetricamente la fibra dietética.

3. La presencia de compuestos asociados debe tenerse en cuenta y cuantificarlos separadamente. La precipitación etanólica y cuantificación gravimétrica podría llevar a su confusión con polisacáridos.
4. Los métodos enzimático y químicos, como el método de Englyst no emplean proteasa, algunos autores consideran innecesario su empleo si al final del proceso se va a corregir la proteína, sin embargo debería tenerse en cuenta que la proteína puede unirse fuertemente a la fibra dietética. De hecho cuando se emplea proteasa y se cuantifica la lignina Klason este valor es inferior al valor que se obtiene cuando no se emplea dicha enzima. En relación con esto también debe considerarse el hecho de que los polisacáridos y los compuestos fenólicos pueden condensar con la lignina y proteína, cuantificándose en el residuo de lignina Klason.

Con la intención de solventar estos problemas metodológicos se ha desarrollado en este laboratorio el concepto de *Fracción Indigerible*, asociado a un método adecuado para su determinación (Saura-Calixto y col. 2000)(figura 3); este método, que simula las condiciones fisiológicas, permite una cuantificación de todos los compuestos que se incluyen en la nueva definición de FD (De Vries, 2004). La definición de fracción indigerible incluye no solo la fibra dietética como tal, si no también otros compuestos resistentes a la acción enzimática: . El concepto de fracción indigerible engloba la fibra dietética (entendida como polisacáridos no digeribles), almidón resistente, proteína resistente y otros compuestos asociados como compuestos fenólicos, de manera que las condiciones analíticas del método deben ser lo más similares posible a las condiciones fisiológicas.

El método empleado para cuantificar la fracción indigerible combina en un solo procedimiento las metodologías para determinar FD (Mañas y col 1994) y análisis de almidón resistente (Goñi y col 1996); las principales premisas en que se basa este método son dos, la primera de ellas es la cuantificación de la fracción indigerible sobre muestras preparadas del mismo modo en que se consumen, mientras que la segunda premisa se centra en las condiciones analíticas. Temperatura, pH y tiempos de incubación deben simular el proceso fisiológico.

Los valores obtenidos mediante este último método (fracción indigestible), son de mayor utilidad en los campos de nutrición y salud y son una alternativa al empleo de los métodos convencionales de determinación de fibra dietética.(Saura-Calixto y col. 2000)

Figura 3. Principales pasos del método para determinar fracción indigerible(Saura-Calixto, 2000).

La falta de datos sobre Fibra dietética en bebidas es atribuible en parte a la ausencia de un método analítico específico, omitiéndose o ignorándose este dato en la tablas de composición de alimentos.

Tomando como base los estudios previos que mostraban las diversas fuentes de error de los métodos usuales de determinación de fibra dietética (Saura-Calixto, 1988; Mañas y col. 1990; Saura-Calixto y col. 1991; Mañas 1992; Mañas y Saura-Calixto, 1995), así como el concepto anteriormente definido de fracción indigerible, se ha desarrollado una modificación del método empleado para la determinación de dicha fracción indigerible en alimentos sólidos, un método específico para determinar y la fibra dietética soluble (entendida como polisacáridos no digeribles), así como el complejo de Fibra dietética soluble y sus constituyentes (la propia FDS, entendida como polisacáridos no digeribles, proteína y compuestos fenólicos asociados). El método, se ha aplicado en cerveza, vino, café y otras bebidas, como se explica detalladamente a en esta memoria.

II. PRINCIPIOS DEL METODO DE DETERMINACIÓN FIBRA DIETETICA EN BEBIDAS Y COMPUESTOS ASOCIADOS.

Conociendo la presencia de fibra dietética en frutas, cereales y otros alimentos de origen vegetal, es lógico suponer que las bebidas que se obtienen a partir de estos alimentos contengan parte, ó incluso la totalidad de la fibra dietética soluble de la materia prima (fruta ó cereal, hierba, hortaliza, tubérculo, del que proceden).

Esta fibra soluble (que incluye polisacáridos , polifenoles asociados y proteína no digerible) puede ser extraída de la fruta, hortaliza cereal u otros alimentos durante el proceso de elaboración de la bebida alcohólica (vino, cerveza) o no alcohólica (zumos, infusiones).

Antes de comentar con detalle los principios en los que se ha basado el desarrollo y posterior aplicación del método para aislar y determinar la FDS y el complejo de fibra dietética en bebidas es necesario conocer los criterios que han servido como base para la elección de las muestras.

La selección de muestras se ha llevado a cabo teniendo en cuenta criterios de consumo en la población española. Esta selección se han llevado a cabo según los datos publicados por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA, 2005). Para la obtención de estos datos de consumo, el Ministerio ha empleado una metodología basada en 3 tipos de Investigaciones:

Investigación en Hogares: Universo: 15 460 000 hogares (muestra de 6200 hogares y 2790 registros/mes); Investigación en Hostelería/Restauración: Universo: 241 490 establecimientos(muestra de 898 establecimientos con 520000registros/3meses) y el tercer tipo, Investigación en Instituciones: Universo: 25 179 establecimientos con 681 millones de servicios (muestra formada por 365 centros recogiendo información 1vez/mes).

Mediante la recogida de estos datos se puede decir que las bebidas mas consumidas en España durante el año 2005, fueron: las bebidas refrescantes (64,95 L/p/año), las bebidas alcohólicas (90L/p/año), los zumos (17.85 L/p/año; siendo el zumo de naranja uno de los mayoritarios con un consumo de 3.91 l/p/año).Otras bebidas de elevado consumo fueron la sidra (1.57 l/p/año), o las infusiones (incluyendo café, el consumo ronda los 4Kg/p/año).

En consecuencia, las bebidas seleccionadas para este estudio se dividieron en 4 grupos :

Grupo 1: Zumos y néctares ; Grupo 2: Bebidas Alcohólicas; Grupo 3: Café e infusiones; Grupo 4: Bebidas Refrescantes y otras bebidas.

Principio del método.

Las diferentes bebidas, debidamente tratadas(concentradas y/o dealcoholizadas según el tipo de bebida) se tratan enzimáticamente con pepsina, α -amilasa y amiloglucosidasa para hidrolizar los constituyentes digestibles (proteína, hidratos de carbono..). Los productos de esta hidrólisis y constituyentes de pequeño tamaño molecular se retiran mediante diálisis (absorción intestinal), mientras que el complejo de fibra dietética soluble (FDS) permanece en el interior de la bolsa de diálisis (no es

absorbido). Este complejo contiene polisacáridos no digeribles y diversos compuestos asociados (proteína y compuestos fenólicos).

Desarrollo del Metodo.

El procedimiento, que trata de simular en la medida de lo posible las condiciones fisiológicas consta de 4 etapas fundamentales y bien diferenciadas, que se esquematiza en la figura 1

1. Preparación de la muestra.

Las bebidas alcoholicas se dealcoholizan y concentran, mediante destilación a vacío; de este modo se evitara interferencias en los análisis y/o determinaciones debidas a la presencia del alcohol y también para al igual que en los zumos y refrescos, aumentar la concentración del complejo de FDS, (por encima del límite de detección). En el caso especial de las infusiones basta con prepararlas más concentradas desde el inicio.

2. Digestión enzimática.

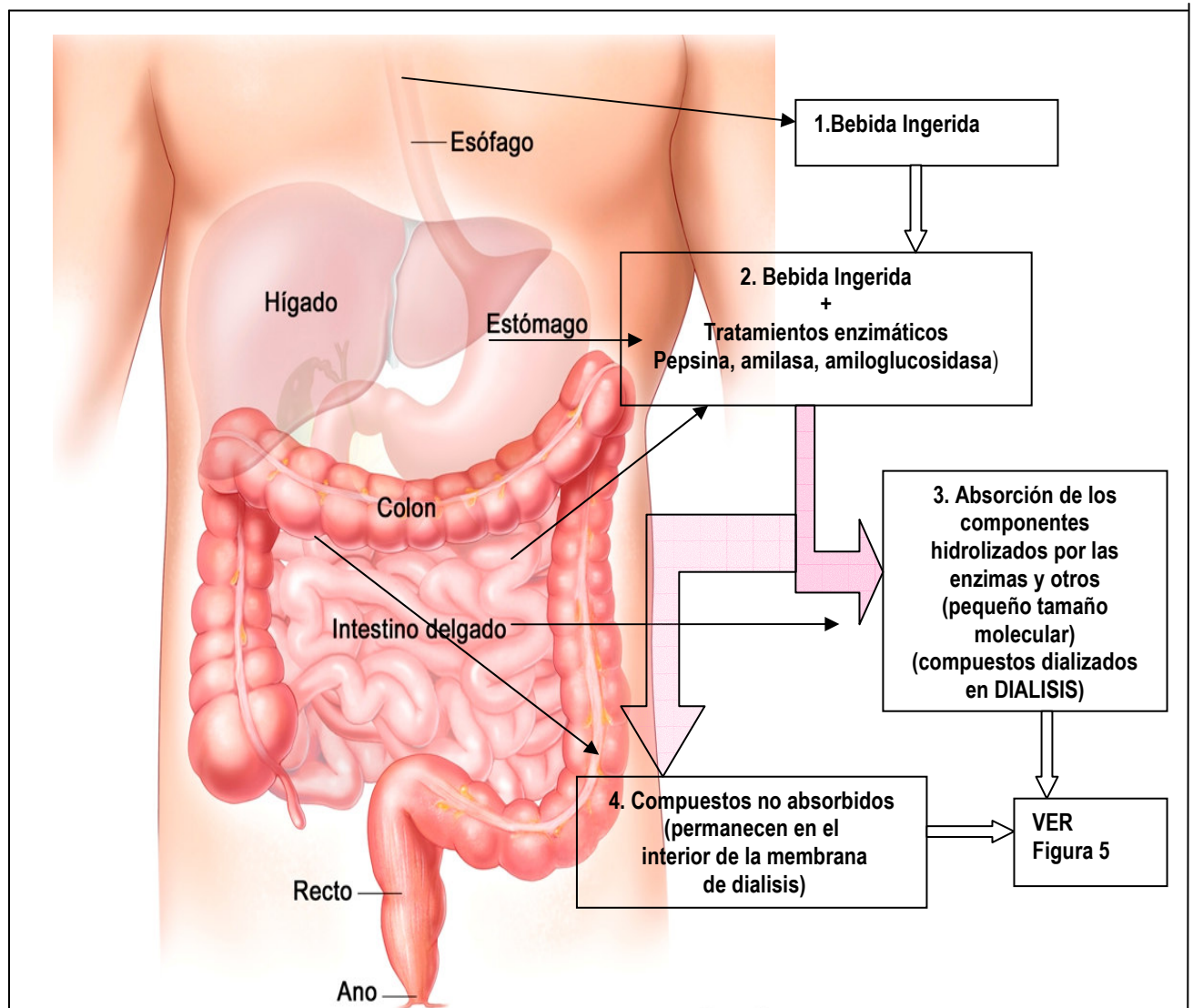
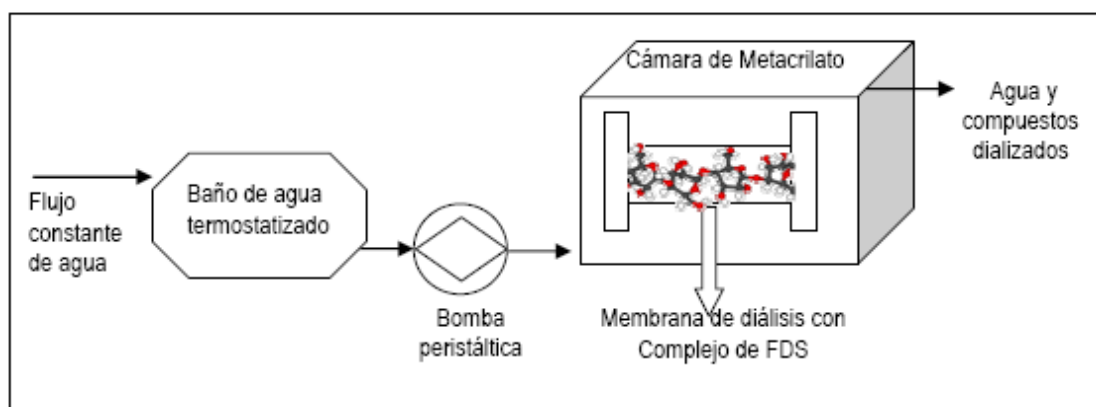
Una vez preparada y /o pre-tratada la muestra, ésta se sometió a una digestión enzimática simulando condiciones fisiológicas. Mediante el empleo de pepsina, α -amilasa y amiloglucosidasa, se hidrolizan las proteínas, péptidos y polisacáridos digeribles. Los polisacáridos no hidrolizados por la enzimas llegarán al intestino "intactos", donde en función de su tamaño molecular podrán ser absorbidos (junto con los componentes hidrolizados)(figura 4). Si no se absorben se consideran componentes de la fibra dietética

3. Separación del complejo de FDS del resto de sustancias.

Se lleva a cabo mediante un procedimiento de diálisis en condiciones de flujo y temperatura controladas. Mediante esta etapa se simula la absorción producida en el intestino delgado.

A través de la membrana de diálisis se produce la difusión (absorción) de todos los productos resultantes de la hidrólisis enzimática (aminoácidos, péptidos, azúcares) junto con otros compuestos de pequeño tamaño molecular (inferior a 12Kda-14kDa) como minerales, vitaminas, ácidos orgánicos, conservantes en el caso de los zumos y refrescos.

En el interior de la bolsa de diálisis (sustancias que no se absorben) se retiene la disolución de fibra, que incluye polisacáridos no digeribles, y otros compuestos asociados a la misma que van a ser objeto de posteriores análisis.

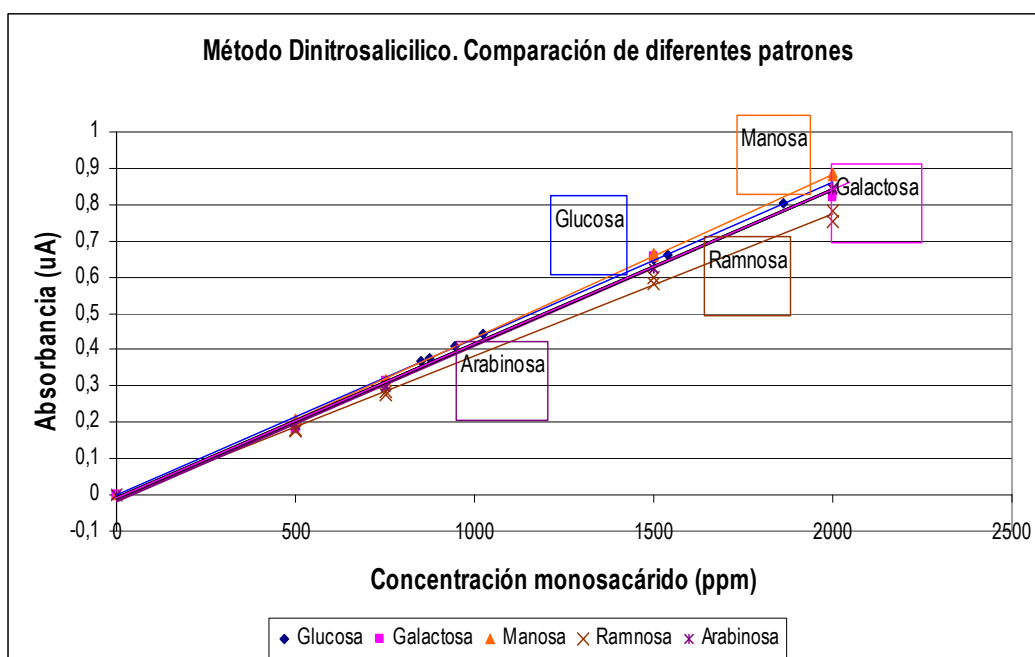
Figura 4. Esquema simulación proceso de digestión**Figura 5.** Esquema simulación absorción intestinal por diálisis

4. *Análisis cuantitativo y cualitativo de los constituyentes del complejo de FDS* (ver procedimientos experimentales): Polisacáridos no digeribles, Compuestos fenólicos. Proteína.

4.1 *Los polisacáridos no digeribles*. Son polisacáridos de elevado tamaño molecular que no han sido hidrolizados por las enzimas; sin embargo los métodos existentes para su determinación se basan en la cuantificación de las unidades monoméricas que forman estos polisacáridos (Scott, 1979; Englyst y Cummings, 1988), por esta causa es necesario realizar una hidrólisis ácida capaz de hidrolizar estas moléculas.

Comúnmente los valores determinados mediante métodos espectrofotométricos (Englyst y Cummings, 1988), se expresan como glucosa (para de este modo poder comparar diferentes muestras analizadas por diferentes laboratorios), presumiblemente el monosacárido mayoritario. Sin embargo, siguiendo las pautas marcadas por Englyst y Cummings (1988), es mas correcto expresar los resultados en función del azúcar ó azúcares que se esperan encontrar mayoritariamente en la muestra. En muestras de cereales, por ejemplo, es más correcto el empleo de una mezcla 3:4:3 de arabinosa:xilosa: glucosa (Englyst y Cummings ,1988) aunque es cierto que excepto en casos excepcionales las diferencias frente al empleo de glucosa no son significativas (Englyst y Hudson , 1987). Siguiendo estas pautas, se realizaron pruebas con diversos azúcares patrón y mezclas de azúcares disponibles en el laboratorio (en proporciones similares a las encontradas en las principales bebidas)(figura 6 y figura 7). De esta manera podríamos observar hasta que punto puede influir el patrón elegido para cuantificar la fibra dietética

Figura 6. Comparación de patrones aislados . Método dinitrosalicílico



Glucosa; $y = 0.0004X + 0.0007$ $R^2 = 1$.

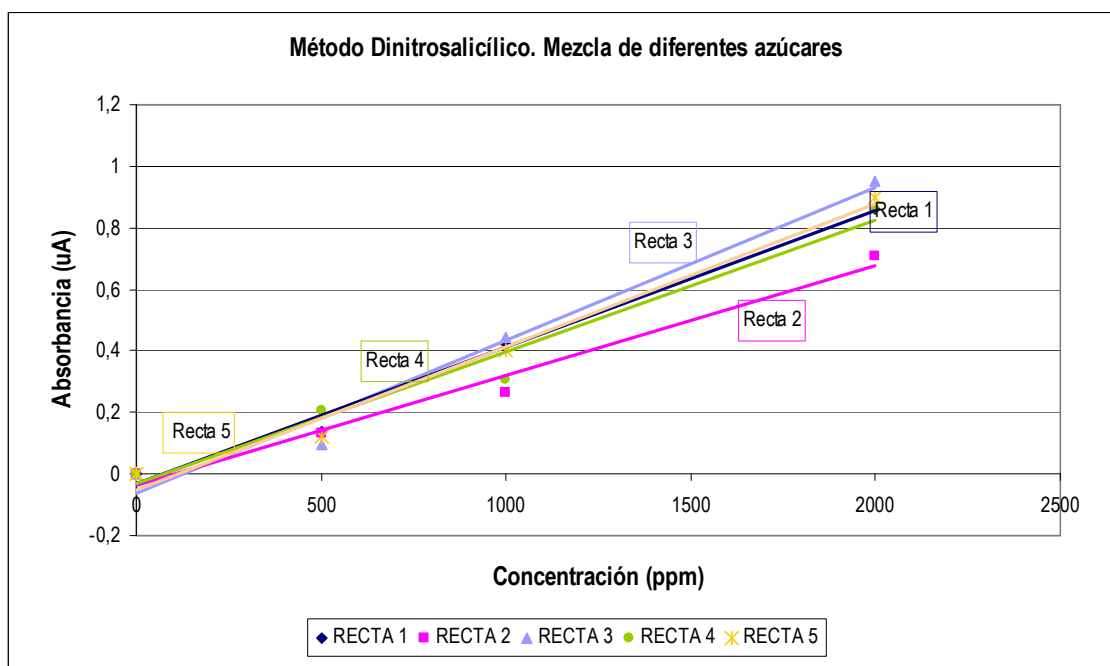
Manosa; $y = 0.0004X - 0.0144$ $R^2 = 0.9993$

Galactosa; $y = 0.0004X - 0.0096$ $R^2 = 0.996$

Ramnosa; $y = 0.0004X - 0.0098$ $R^2 = 0.998$

Arabinosa; $y = 0.0004X - 0.0152$ $R^2 = 0.9995$.

Figura 7. Comparación de mezclas de patrones empleando método dinitrosalicílico



Recta 1. Glucosa: galactosa (1:1). $Y = 0.0004X - 0.0318$ $R^2 = 0.991$.

Recta 2. Glucosa: galactosa:arabinosa (1:1:3). $Y = 0.0004X - 0.036$ $R^2 = 0.98$.

Recta 3. Glucosa: galactosa: arabinosa (1:2:3). $Y = 0.0005X - 0.0628$ $R^2 = 0.97$.

Recta 4. Glucosa: galactosa: arabinosa: manosa (3:1:1:2). $Y = 0.0004X - 0.029$ $R^2 = 0.97$.

Recta 5. Glucosa: galactosa: arabinosa (1:3:1). $Y = 0.0005X - 0.0504$ $R^2 = 0.98$.

La ramnosa tiene un mayor factor de respuesta que el resto de azúcares aislados. Con una menor absorbancia se obtiene la misma concentración. Sin embargo la diferencia no es significativa. La recta 2 de mezcla de patrones tiene un mayor factor de respuesta que el resto, patrones aislados como si observamos las mezclas de patrones, pero al igual que sucedía con la ramnosa, la diferencia no es significativa, por lo que finalmente se usó glucosa como azúcar patrón del método colorimétrico.

En relación con la determinación de los polisacáridos no digeribles (fibra dietética propiamente dicha) que forman parte del complejo de FDS, se llevaron a cabo otros análisis complementarios (ver *Análisis complementarios*), que se explican más adelante por ser específicos de ciertas bebidas.

4.2 *Compuestos fenólicos asociados. Disponibilidad intestinal.* Para evaluar este parámetro de disponibilidad, es decir la existencia de compuestos fenólicos asociados y su comportamiento, se determinaron los compuestos fenólicos (cromatográficamente y espectrofotométricamente), así como su correspondiente capacidad antioxidante durante las diferentes etapas del proceso:

4.2.1. Determinación en la propia bebida, zumo ó infusión.

4.2.2. Determinación en el líquido retenido en la bolsa de diálisis (no absorbido por el intestino), es decir fenoles asociados en el complejo de FDS.

4.2.3. Determinación de los compuestos fenólicos tras llevar a cabo diferentes hidrólisis. Estas hidrólisis se realizaron sobre el complejo de FDS con el objeto de intentar romper ese complejo y liberar los compuestos fenólicos. De esta manera conoceríamos qué compuestos fenólicos están unidos y cuáles son disponibles o no. Por esta razón se probaron diferentes tipos de hidrólisis: hidrólisis ácida (débil y fuerte), hidrólisis ácido/básica, y finalmente hidrólisis enzimática (figura 8).

4.2.3 a. La denominada *Hidrólisis ácida fuerte* es la misma hidrólisis empleada para hidrolizar químicamente los polisacáridos. Esta hidrólisis emplea condiciones muy drásticas de ácido y temperatura, por eso se decidió observar en primer lugar el comportamiento de fenoles aislados (patrones), en estas circunstancias (Tabla 1). De este modo se observó como determinados fenoles simples son degradados en estas condiciones hasta desaparecer, mientras otros permanecen inalterados.

Tabla1. Hidrólisis ácida de patrones de compuestos fenólicos. Variación en concentración

Disolución patrón ^a	% Desaparición
Ac. Galico	0.7
Ac. Cafeico	0
Quercetina	98.7
Catequina	55.9
Cianidina	53.2

^a Disoluciones preparadas en agua

4.2.3.b La hidrólisis ácida débil, (metanol acidificado con ácido clorhídrico a pH=2) apenas ejerce efecto alguno sobre la muestra de complejo de FDS. Los compuestos fenólicos determinados de esta manera eran muy similares a los determinados previamente a la hidrólisis

4.2.3. c. La Hidrólisis ácido/básica es un método de hidrólisis que emplea secuencialmente ácido clorhídrico y Metanol con sosa. Sin embargo, este método que se ha empleado exitosamente para

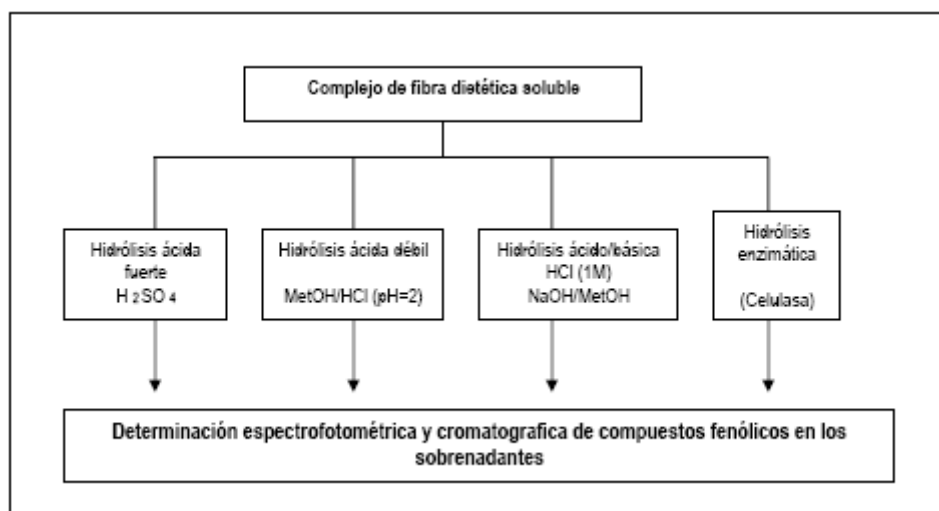
separar compuestos fenólicos de proteína, en este caso (separar polifenoles de fibra dietética soluble) no generó resultados.

4.2.3.d.Hidrólisis enzimática. Al observar el nulo efecto del resto de hidrólisis y basándonos en diversos artículos que se adentran en la aplicación de este tipo de hidrólisis (Pinelo y col, 2006; Grabber y col 1998; Kammeremer y Claus, 2005; Landbo y Meyer 2001), se realizó un último ensayo realizando una hidrólisis de tipo enzimático.

Diversos estudios han postulado(Kammeremer y Claus, 2005) la existencia de enlaces tipo éster entre compuestos fenólicos y ciertos polisacáridos de las paredes celulares. La celulasa (E.C. 32.1.4) es una enzima que hidroliza enlaces endo-1,4- β -D-glicosídicos no solo en celulosa, también actúa sobre otros sustratos como β glucanos, liquenina, y celooligosacáridos (Hurst y col. 1978), similares a enlaces tipo éster. Este hecho unido al fácil acceso y disponibilidad de la enzima nos llevó a su utilización. Aunque la enzima empleada no es fisiológica (no existe celulasa en el cuerpo humano), en este punto nuestro interés era puramente químico, es decir conocer qué compuestos fenólicos están unidos y no van a ser absorbidos, sino que van a llegar al colon

Las enzimas tienen especificidad de sustrato, así como condiciones de presión y temperatura propias de cada una de ellas, es por ello que los datos presentados a lo largo de esta memoria deben considerarse orientativos . Para lograr una hidrólisis completa sería necesario el empleo de una compleja mezcla de enzimas.

Figura 8. Hidrólisis realizadas para hidrolizar el complejo de fibra



De forma complementaria se procedió a determinar la actividad antioxidante en las bebidas, el complejo de FDS sin hidrolizar y en los complejos de FDS hidrolizados enzimáticamente. Estas

determinaciones se basaban en el hecho conocido de la elevada correlación entre capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos.

Del mismo modo que sucedía con los polisacáridos, en algunos casos se hizo necesario realizar diversos análisis específicos y complementarios que se comentan más adelante.

4.3 Proteína. Según datos bibliográficos (Zarra y Revilla, 1993; Clarke y col en 1979), las proteínas o glicoproteínas pueden ser importantes constituyentes de las paredes celulares debido a su unión con polisacáridos de la pared celular, siendo por tanto, constituyentes del complejo de fibra dietética.

La proteína soluble se determinó en la bebida y en el complejo de FDS, sin hidrolizar. De esta manera se pudo discernir la proteína soluble que no se digería porque permanece en el complejo. Para su determinación se empleó el método Bradford, capaz de cuantificar proteína soluble.

5. Fermentación colónica *in Vitro*.

El complejo de fibra que no ha sido absorbido va a llegar intacto al colon donde puede ser utilizado como sustrato por la microflora colónica. Este proceso se denomina fermentación colónica.

Mediante la cuantificación de los diversos metabolitos que se producen en este proceso se puede conocer la fermentabilidad de la fibra dietética (parámetro importante en salud intestinal) y proponer un acercamiento al conocimiento de la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos asociados a la fibra

El método de fermentación colónica empleado en esta tesis cumple los requerimientos establecidos (Mcfarlane y Macfarlane, 1993; Goñi y Martín Carrón, 1998; Topping y Clifton, 2001) en cuanto al tipo de inóculo (bacterias cecales), tipo de sustrato (diferentes compuestos incluidos en el complejo de fibra dietética soluble) y tiempo de fermentación (24 horas). De esta manera los resultados obtenidos pueden compararse a lo que realmente sucede de manera fisiológica

I. MUESTRAS.

Basádonos en los estudios de consumo del Ministerio de Agricultura y Pesca, así como de diversos centros comerciales se seleccionaron bebidas de marcas con mayor presencia en el mercado español:

Grupo 1: Zumos y néctares (para más detalle ver capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en otras bebidas de la dieta española)

Néctar de naranja (Juver alimentación S.L.U.)

Zumo de naranja natural (elaborado en el momento).

Zumo de naranja y soja (Don Simón, Hnos. Garcia Carrion).

Néctar de manzana (Juver alimentación S.L.U.)

Néctar de piña (Juver alimentación S.L.U.)

Zumo de piña y uva (Hacendado, fabricado por Hnos. Garcia Carrión)

Néctar de melocotón (Juver alimentación S.L.U.)

Zumo de melocotón y uva (Hacendado, fabricado por Hnos. Garcia Carrión).

Mosto (Don Simón, Hnos. Garcia Carrion).

Zumo de tomate (Hero España, S.A.).

Grupo 2. Bebidas Alcohólicas (para más detalle ver capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en cerveza y capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en vino).

Cerveza rubia: Mahou 5 estrellas (Mahou S.A.).

Cerveza sin alcohol: San Miguel 0.0. (San Miguel, fábricas de cerveza y Malta, S.A.)

Cerveza negra: Mahou Negra. Cerveza especial 1890.(Mahou S.A.)

Vinos tintos de pertenecientes a diferentes denominaciones de origen: D.O Ribera de Duero;

D.O La Mancha, D.O. Rioja; D.O. Jumilla; D.O. Penedés

Vinos blancos de distintas denominaciones de origen: D.O Rueda; D.O. La Mancha.

Sidra natural (Miravalles, Villaviciosa. Asturias)

Grupo 3. Café e infusiones (para más detalle ver capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en café y capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en otras bebidas de la dieta española).

Café procedente de Colombia, y café liofilizado 100% puro Colombia, ambos de Cafés La Mexicana Rodríguez y Mateus S.A. Madrid, España.

Te Rojo (Pompadour para el corte inglés)

Poleo-Menta (Pompadour para el corte inglés)

Manzanilla (Pompadour para el corte inglés).

Grupo 4. Bebidas Refrescantes y otras bebidas. (para más detalle ver capítulo: fibra dietética y compuestos asociados en otras bebidas de la dieta española)

Bebida Isotónica (Aquarius, The Coca cola Company).

Água tónica (Tónica Schwepps).

Refresco de cola (Coca cola, The Coca cola Company).

Refresco de naranja (Trinaranja, Schwepps).

Bebida láctea de cacao (Cola Cao, Nutrexp).

Horchata (Don Simon, Hnos. Garcia Carrión).

II. REACTIVOS.

1. Reactivos Generales para aislar el complejo de fibra dietética soluble

- Disolución tampón HCl/KCl. 0.2M; pH=1.5.
- Disolución tampón Trizma-Maleato. 0.1M,; pH=6.9.
- Disolución tampón $\text{H}_3\text{CCOOH}/\text{H}_3\text{CCOONa}$. 0.2M; pH=4.75.
- Pepsina 100mg/ml: pepsina (EC 3.4.23.1). 2000 FIP-U/g (Merck 7190. Darmstadt, Germany) en tampón HCl/KCl. 0.2M; pH=1.5.
- α -amilasa 40mg/ml : α -amilasa (E.C. 3.2.1.1.) 17.5 U /mg (Sigma A3176. Madrid , Spain) en tampón Trizma-Maleato. 0.1M,; pH=6.9.
- Amiloglucosidasa 14 U/mg (Roche 102857 Mannheim, Germany)

2. Reactivos específicos para determinar la fibra dietética soluble(polisacáridos) y sus constituyentes.

2.1. Determinaciones espectrofotométricas.

Todos los reactivos empleados en las determinaciones espectrofotométricas fueron de grado analítico.

- Reactivo dinitrosalicílico 10g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Panreac), 16g de hidróxido sódico y 300g of tartarato sodico potásico en 1 litro.
- Hidróxido sódico (3.9N).
- Disolución de cloruro sódico: ácido bórico ; 20g:30g en 1L de agua destilada.
- Disolución de dimetilfenol: 10mg dimetilfenol (Merck) / 10ml ácido acético glacial.
- Patrones: D(+) glucosa (Merck); ácido D- galacturónico (Sigma)

2.2. Determinaciones cromatográficas.

- Disolución de Mio-inositol: 1mg mio-inositol (Merck) en 1mL ácido sulfúrico 1M .
- Disolución de Acido sulfúrico 1M
- Disolución de hidróxido amónico 3M.
- Disolución de hidróxido amónico 12M.
- Disolución de borohidruro sódico. Disolver 50mg de borohidruro sódico (Merck)/mL de hidróxido amónico 3M.
- 1-Metilimidazol (Merck)
- Hidróxido Potásico 7.5M
- Azul de Bromofenol(Merck)
- Octan-2-ol (Merck) , Anhídrido acético,Acido acético glacial y Etanol Absoluto
- *Patrones cromatograficos:* L(+) Arabinosa (A-3131, Sigma).
 - D(+) Galactosa(G0750 Sigma).
 - D(+) GLucosa (G-5250, Sigma).
 - D(+) Manosa (901277, Merck).
 - L(+) Ramnosa (9012775, Merck)
 - D(+) Xilosa (X-1500, Sigma)

3. Reactivos específicos para la determinación de compuestos fenólicos.

3.1.Determinación de compuestos fenólicos espectrofotometricamente.

- Carbonato sódico anhidro (75g/L)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu. (Panreac).

3.2 Determinación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE ó HPLC).

- Acetonitrilo (Panreac).
- Ácido ortofosfórico (Sigma-Aldrich).
- Amoníaco (Merck).
- Fosfato amónico (May & Baker).
- *Patrones Cromatograficos:* Acido Gálico (G-7384, Sigma)
 - Catequina (C-1251, Sigma)
 - Acido cafeico (C-0625, Sigma)
 - Rutina (R-5143, Sigma)

Malvandin-3-o- galactosido (931S, Extrasynthese).

3.3 Hidrólisis Enzimática de compuestos fenólicos asociados

- Tampon acido acético/acetato sódico (0.2M) pH=4.
- Celulasa (E.C. 32.1.4.) (C1184, Sigma).

4 .Reactivos específicos para determinar capacidad antioxidante

- 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma –Aldrich).
- 2,4,6-tri(2-pyridyl)-5-triazine (TPTZ) (Fluka Chemicals).
- Reactivo del Método FRAP: mezclar 25ml tampón Acetadto sódico pH=3.6 ,2.5ml disolución $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 ml disolución de TPTZ en HCl 40mM
- Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)(A1888; Sigma)
- Radical ABTS ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) :Se genera haciendo reaccionar una disolución stock de ABTS 7mM con persulfato potásico 2.45mM

5 .Reactivos específicos para determinar proteina.

- Kit comercial Bio-Rad Protein assay. Bio-Rad Laboratorios GmbH.
- Albumina bovina (A- 8022 Sigma).

6 .Reactivos Fermentación colónica *in vitro*.

- Disolución macromineral: Bicarbonato Sódico, Fosfato de Potasio monobásico, Magnesio Sulfato 7-hidrato (todos Panreac)
- Solución Micromineral : Cloruro Cálcico anhidro, Cloruro de Manganeso II 4-hidrato, Cloruro de Cobalto II 6-hidrato, Cloruro de Hierro III 6- hidrato (Panreac)
- Solución Tampón: Bicarbonato Amónico y Bicarbonato Sódico (Panreac)
- Solución reductora: Hidrocloruro de L-cisteina (C-1276, Sigma), Sodio Sulfuro 9-hidrato, Hidróxido Sódico (Panreac).
- Solución de Resazurina: Resazurina (Panreac) 0.1% p/v
- Medio de Fermentación : Triptona (Biolife), solución micromineral, solución macromineral, solución tampón y resazurina.
- Patrón 100% fermentable: Lactulosa (L-7877 sigma)

- ### III. EQUIPOS.

- *Cromatógrafos de gases:*

B) Determinación de ácidos grasos de cadena corta: Hewlett Packard-5890, con detector de ionización de llama, autoinyector, automuestreador, integrador, HP-3390 A. Columna de sílica (Carbowax 20M, 10mx0.53mm i.d.).

- 53

IV. OTROS MATERIALES

- Bolsas de diálisis: membranas de celulosa con punto de corte para peso molecular 12000-14000, Dialysis Tubing Visking, 9-.32-36 mm (Medicell International, Ltd).
- Bolsas Stomacher 80 (Seward Medical).
- Tela Dacron diámetro de poro 150µm.

V. METODOS EXPERIMENTALES

1. Método para aislar el complejo de Fibra dietética soluble.

Las infusiones, refrescos, bebidas, debidamente preparadas (concentradas y/o desgasificadas dependiendo del tipo de bebida) se incubaron durante 40 minutos a 40°C con 0.5ml de una disolución de pepsina. Transcurrido este periodo se añade 5ml de α -amilasa, seguido de una incubación de 3 horas a 37°C. Finalmente se tratan las muestras con 0.4ml de amiloglucosidasa ajustando el pH (pH= 4.75), y se someten a una incubación de 45 min a 60°C.

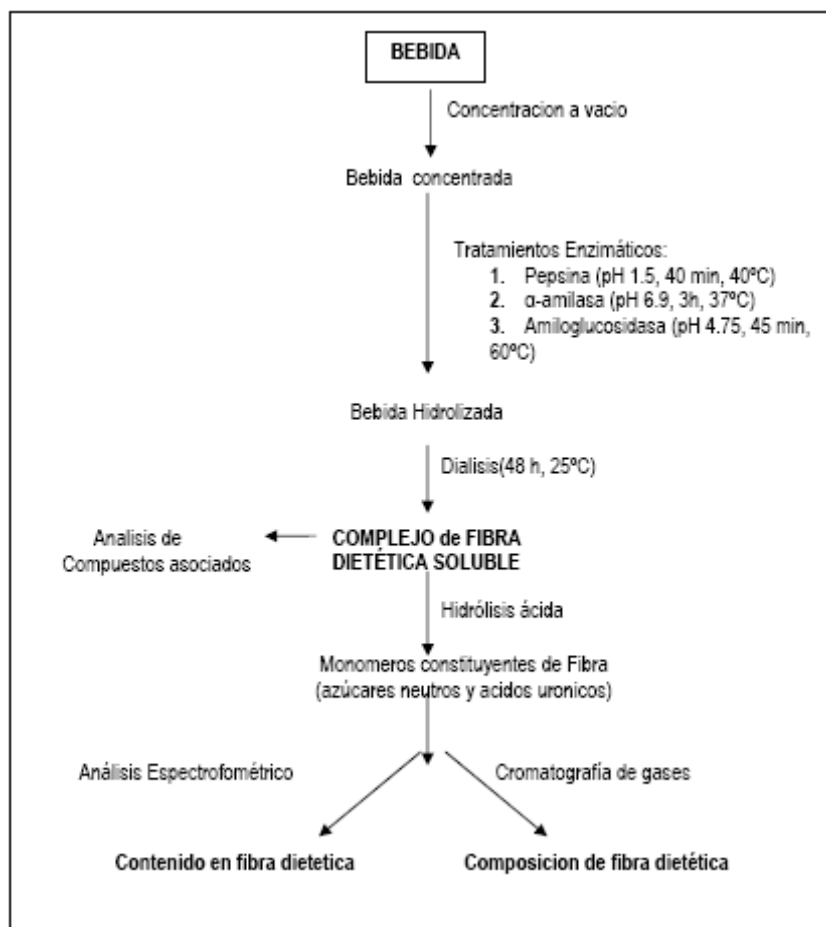
Una vez finalizados los tratamientos enzimáticos, las muestras se transfieren a bolsas de diálisis, y dializadas durante 48 horas a 25°C (flujo de agua de 7l/h) (Saura-Calixto y col 2000); Transcurrido este tiempo, los dializados se llevan a un volumen final de 100ml, obteniéndose de este modo el complejo de fibra dietética soluble debidamente aislado (figura 1).

2 Determinación del contenido en fibra dietética soluble (polisacáridos) y sus constituyentes

2.1. Contenido en fibra dietética soluble.

La Fibra dietética soluble (FDS), se determinó en la hidrólisis de los complejos de FDS; se llevó a cabo una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico 1M a 100°C, durante 90 minutos, transcurrido ese tiempo tras enfriar los tubos hasta temperatura ambiente se determinó el contenido total de fibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles) con ácido dinitrosalicílico (Englyst y Cummings, 1998), leyendo la absorbancia a 530nm, y calculando la concentración de FDS (polisacáridos no digeribles) usando glucosa como disolución patrón.

Figura 1. Esquema general del procedimiento experimental para aislar el complejo de fibra dietética soluble



2.2. Determinación de la composición de la fibra dietética (polisacáridos)

2.2.1 Determinación de Azúcares Neutros.

Los Azúcares neutros (constituyentes monoméricos) se determinaron en los hidrolizados de la fibra dietética soluble, como acetatos de alditol (Englyst, H.N.; Cummings, J.H. 1998), obtenidos usando N-metil-imidazol para catalizar la acetilación

2.5 mL de los hidrolizados y 0.5 mL de Inositol se trataron con hidróxido amónico 12M hasta obtener un pH alcalino. A continuación, se añadió borhidruro sódico y octanol, se incubó en bloque a 40°C durante 1 hora. Posteriormente, se añadió ácido acético para acidificar las muestras. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL a las que se añadió 0.5 mL de 1-metilimidazol y 5 mL de anhídrido acético, tras 10 minutos se añadió 1.2 mL de etanol absoluto a cada muestra, 5 minutos más tarde se adicionó 9 mL de agua destilada y 0.5 mL de azul de bromofenol, solución indicadora. Se enfriaron los tubos y se añadió

KOH 7.5M para conseguir la separación de fases. Se recogió la fase superior conteniendo los acetatos de alditol que se analizaron por cromatografía.

Las condiciones analíticas fueron: temperatura de columna de 240°C (isoterma), temperatura del inyector y del detector fueron de 270°C, y el gas transportador consistió en nitrógeno (3ml/min).

2.2.2. Determinación de Ácidos Urónicos.

Los Ácidos Urónicos se cuantificaron en los hidrolizados de la fibra dietética soluble, empleando el método de Scott (Scott,1979), usando ácido galacturónico como patrón y 3,5- dimetilfenol como reactivo colorimétrico.

3. Determinación de Compuestos Fenólicos.

3.1 Determinación de compuestos fenólicos totales.

La determinación de polifenoles totales, tanto en la bebida como en el complejo sin hidrolizar se llevó a cabo siguiendo el método de Montreau (1972).

Se realizó una recta patrón de ácido gálico preparando soluciones de 50, 100, 150, 200, 300 y 400 ppm a partir de una solución madre diluyendo convenientemente. Se realizó una curva patrón cada vez que se realizó la determinación. Se calculó la ecuación de la recta patrón de ácido gálico y por interpolación en la misma se obtuvieron las concentraciones de las soluciones problema.

3.2 Análisis de compuestos polifenólicos por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE ó HPLC)

Las diferentes bebidas, infusiones, refrescos así como sus correspondientes complejos de FDS e hidrólisis enzimáticas (de dichos complejos) fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), siguiendo el método descrito por Lamuela-Raventós y Waterhouse (1994), modificado en nuestro laboratorio.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Los solventes ó fases empleados:

Solvente A = fosfato amónico, ajustado a pH 2.6 con ácido ortofosfórico.

Solvente B = 20% A con 80% acetonitrilo.

Solvente C = ácido ortofosfórico 0.2M ajustado a pH 1.5 con amoniaco.

Las condiciones del gradiente fueron:

Tiempo	A(%)	B(%)	C(%)	Flujo(ml/min)
0	100	0	0	0.5
5	100	0	0	0.5
15	96	4	0	0.5
25	92	8	0	0.5
25.01	0	8	92	0.5
45	0	20	80	0.5
50	0	30	70	0.5
55	0	40	60	0.5
60	0	80	20	0.5
65	100	0	0	0.5
70	100	0	0	0.5

La identificación se realizó de acuerdo a los tiempos de retención y características espectrales de los compuestos individuales, mientras que la cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó clasificándolos dentro de 3 grandes grupos , que a su vez se subdividen, y por calibración con compuestos individuales:

1. Ácidos benzoicos, como equivalentes de ácido gálico empleando como longitud de onda de mayor absorción $\lambda=280$ nm

$$\text{Área}=(405.9 \times \text{concentración})-105$$

2. Ácidos hidroxicinámicos, como equivalentes de ácido cafeico gálico empleando como longitud de onda de mayor absorción $\lambda= 320$ nm.

$$\text{Área}=(711.5 \times \text{concentración})-1231$$

3. Flavonoides:

3.a. Flavonoles como equivalentes de Rutina empleando como longitud de onda de mayor absorción $\lambda= 365$ nm.

$$\text{Área}=(123.4 \times \text{concentración})+142$$

3.b. Flavan-3-oles, como equivalentes de Catequina empleando para cuantificar la longitud de onda $\lambda = 280$ nm.

$$\text{Área} = (134.4 \times \text{concentración}) + 42$$

3.c. Flavanonas como equivalentes de Narigenina empleando como longitud de onda de mayor absorción $\lambda = 280$ nm.

$$\text{Área} = (126 \times \text{concentración}) + 333$$

3.d. Antocianinas como equivalentes de Malvidina usando para cuantificar la longitud de onda de mayor absorción. $\lambda = 520$ nm

$$\text{Área} = (292 \times \text{concentración}) - 687.$$

3.3. Hidrólisis enzimática de compuestos fenólicos asociados.

A pesar de que en ciertas bebidas se probaron diferentes tipos de hidrólisis, finalmente la hidrólisis enzimática con celulasa resultó la más conveniente y la que se empleó de manera sistemática con todas las bebidas.

El procedimiento consiste en tomar 5ml del complejo de FDS y ajustar a pH=4 (pH idóneo para la actuación de la enzima). Sobre esta alícuota se añaden 0.3g de celulasa y se realiza una incubación a 37°C, que durará 16 horas.

Finalizada la incubación se centrifugan las muestras separando los sobrenadantes en los que se determinaran los compuestos fenólicos tanto espectrofotométricamente, como por CLAE, así como su actividad antioxidante.

4. Determinación de actividad antioxidante.

4.1. Método FRAP. (Pulido, Bravo y Saura-Calixto. 2000)

El reactivo FRAP (900 μ L), preparado en el momento, y guardado a 37°C, se mezcla con 90 μ L de agua destilada y se añaden 30 μ L de muestra o sustancia patrón o un blanco adecuado. La absorbancia se lee a 530nm (máximo de absorción) cada 15 segundos. Los datos de absorbancia obtenidos a 4 y 30 min fueron los que se emplearon para calcular los valores de capacidad antioxidante, empleando disoluciones patrón de Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), para expresar los resultados.

4.2. Método ABTS (Re y col. 1999).

En este método el catión radical ABTS ($\text{ABTS}^{\cdot+}$) se genera haciendo reaccionar una disolución stock de ABTS 7mM con persulfato potásico 2.45mM, guardando la mezcla protegida de la luz y a temperatura ambiente durante 12-16 horas antes de su uso. La disolución obtenida de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ se diluye con metanol hasta conseguir una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 658 nm; después se añaden 100 μL de muestra o patrón o Trolox sobre 3.9 ml de la solución $\text{ABTS}^{\cdot+}$ diluida y se realizan lecturas de absorbancia cada 20 segundos. El progreso de la reacción es controlado durante 6 minutos. Finalmente se representa en una gráfica el porcentaje de inhibición frente al tiempo (0-6min) y se calcula el área bajo esta curva, empleando Trolox como patrón.

5. Fermentación colónica *in vitro*

Se empleó como inóculo el contenido cecal de ratas Wistar y se fermentó el complejo de fibra dietética soluble (formado por polisacáridos no digeribles, compuestos fenólicos asociados y proteína no digerible) durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis empleando dióxido de carbono libre de oxígeno.

Para preparar el inóculo, el contenido cecal de las ratas se diluyó (100g/L) en el medio de fermentación; posteriormente se homogeneiza el inóculo durante 10 minutos en un Stomacher 80 Lab Blender y se filtra (1mm de tamaño de poro).

Para preparar el sustrato, se liofilizaron los correspondientes complejos de FDS aislados de tal modo que se emplearon 100mg en cada botellita de fermentación, es decir se alcanzó una concentración final en cada botellita de fermentación del 1%(p/v).

Finalmente, se pesaron 100 mg de sustrato (complejo de FDS liofilizado) en botellas de fermentación de 50 mL de capacidad, y hidrataron con el medio de fermentación (8mL) durante 16 h, a 4°C. Posteriormente, se añadieron 2 mL de inóculo a las botellas de fermentación, siendo la concentración final del inóculo en las botellas de 2% (p/v). Las botellas se incubaron en condiciones de anaerobiosis en baño termostatzado a 37°C, durante 24h con agitación suave. Se utilizó lactulosa como patrón (sustrato 100% fermentable).

Transcurridas 24h de incubación se midió el pH y se detuvo la fermentación por alcalinización excesiva del medio con NaOH. Se centrifugó y se separaron los sobrenadantes de los residuos.

En cada ensayo de fermentación se incluyeron cuatro controles, dos blancos de fermentación sin sustrato, y dos botellas con lactulosa como patrón totalmente fermentable y triplicados de la muestra ensayada para cada tiempo experimental (0 y 24 horas).

5.1. Residuo no fermentado.

Los residuos resultantes tras 24h de fermentación, se lavaron sucesivamente con NaOH 0.9%, Etanol 965 y acetona y se secaron a 60^a para un posterior análisis de compuestos fenólicos (si fuera necesario) ó a 100°C para su simple cuantificación gravimétrica.

5.2. Determinación de ácidos grasos de cadena corta.

Los AGCC se determinaron por cromatografía de gases siguiendo el método de Spiller y col. (1980). Como estándar interno se empleó ácido 4-metil-n-valérico.

Se tomaron 400 µL del sobrenadante obtenido de las muestras de fermentación y se mezclaron con 500 µL de patrón interno (ácido 4-metil-n-valérico, 2mM) y 50 µL de ácido fórmico (12%), y 50µL con agua milli-Q. La mezcla se centrifugó (4°C, 7300g durante 15 min), y finalmente 1 µL del sobrenadante se inyectó en el cromatógrafo de gases. Cada muestra se preparó e inyectó por duplicado.

Las condiciones cromatográficas fueron:

Gas portador: nitrógeno.

Presión = 17 KPa

Temperatura de la columna: 120°C (isoterma),

temperatura del inyector y del detector de 200°C.

Los AGCC se identificaron y cuantificaron por comparación con patrones de ácidos grasos volátiles conocidos.

En cada ensayo de fermentación se incluyó lactulosa como patrón totalmente fermentable. Para cada muestra ensayada se calculó el porcentaje de fermentabilidad con respecto a lactulosa, considerando la producción total de AGCC de la lactulosa a 24 horas como 100% de fermentabilidad.

$$\text{Fermentabilidad con respecto lactulosa(\%)} = \frac{\text{AGCC totales}_{\text{muestra}}}{\text{AGCC totales}_{\text{lactulosa 24h}}}$$

6.Determinación de proteína total soluble y soluble no digerible

La proteína se determinó en las bebidas y en los correspondientes complejos empleando el Kit “Bio –Rad protein assay” basado en el método Bradford (Bradford, 1976).

Este método se basa en la reacción de las proteínas solubles y polipéptidos con el reactivo Coomassie Blue G-250 que genera un compuesto coloreado cuya absorbancia se lee a 595 nm.

7.Tests y análisis especiales.

En ciertas ocasiones ha sido necesario llevar a cabo determinados análisis específicos (fundamentalmente en el caso del vino y el café), que se explican detalladamente en sus respectivos capítulos.

- Análisis para discernir si el Ramnogalacturonano II forma parte de la fibra dietética del vino (aplicable a otras bebidas que contengan este polisacárido).
- Análisis para demostrar que los compuestos fenólicos del complejo de FDS del vino están asociados a la fibra y no son artefactos, debidos a interacciones con enzimas. (aplicable a otras bebidas).
- Hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado sobre compuestos fenólicos asociados del vino, para intentar romper esa unión ó asociación.
- Determinación de fibra dietética (polisacáridos o digeribles) en los posos del café y su respectivos granos molidos tostados.
- Determinaciones para elucidar la influencia ó interacciones de las melanoidinas del café.

8. Análisis Estadístico.

El tratamiento estadístico de los resultados se ha realizado empleando el programa SPSS. En los casos en los que el número de replicas lo ha permitido.

FIBRA DIETICA SOLUBLE Y COMPUESTOS ASOCIADOS EN

BEBIDAS

I. ANTECEDENTES

1. VINO. DEFINICIÓN, ELABORACIÓN y COMPOSICIÓN GENERAL

Según la ley 24/2003 de 10 de julio de la Viña y del Vino ((Jefatura de estado. B.O.E 11/07/03), se define vino como el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total ó parcial de la uva fresca, estrujada ó no, ó de mosto de uva. y con una graduación alcohólica mínima de 9º, salvo excepciones como los vinos dulces naturales, txacolí y vinos enverados.

El vino es una materia viva, compleja, que evoluciona cambiando sus propiedades y composición según diversos factores. Una de las principales características de esta bebida es su enorme complejidad, potenciada por más de 500 sustancias, la mayoría compuestos volátiles de carácter aromático, que se encuentran disueltos en una solución de agua y alcohol.

La calidad de un vino es el resultado del tipo y/o clase de uva, el suelo en el que se ha cultivado la uva, la localización y el clima de la zona vitícola y por supuesto del proceso de vinificación (fermentación, levaduras).

La vinificación es el proceso de elaboración del vino, desde el momento en que se selecciona y recoge la uva, hasta la obtención final de un vino de calidad; de este modo, en términos técnicos debemos considerar al vino como el resultado de 2 complejos procesos bioquímicos:

El primero de ellos tiene lugar en la vid, en el que la planta toma del suelo gran parte de los elementos y oligoelementos que posteriormente formarán parte del mosto y del vino (**agua, minerales, etc.**) y sintetiza a través de la fotosíntesis el resto de componentes (**azúcares, ácidos, etc**) que la vid no encuentra en el suelo, pero que posteriormente formarán parte también del mosto y del vino. Lógicamente para que éste proceso se lleve a cabo, hay que aplicar una serie de técnicas vitícolas, que van a condicionar en gran medida la calidad del vino que se obtenga de esas uvas.

El segundo proceso bioquímico, tiene lugar en la bodega, y que básicamente consiste en la fermentación del mosto de la uva. Durante esta etapa los azúcares del mosto se transforman en alcohol y aparecen gran cantidad de nuevos componentes: ácidos, aromas, etc que irán configurando el vino recién nacido.

Basándonos en este proceso general de vinificación existen 3 principales tipos de vinificaciones, en función del vino que queramos elaborar: vinificación en blanco, vinificación en tinto ó vinificación en rosado, aunque puedan existir otros tipos de vinificaciones atendiendo a otros criterios (Figura 1).

VINIFICACIÓN EN BLANCO.

Cuando la uva llega a la bodega se descarga en la tolva de recepción de donde es conducida directamente a la máquina estrujadora; la pasta resultante de esta máquina es trasladada hasta las prensas, tras el prensado se realiza la separación de mostos o *desvinado*. El mosto resultante de esta etapa del proceso se denomina mosto yema, flor o de lágrima.

Se siguen realizando presiones de manera creciente, obteniendo mostos de diferentes calidades, hasta que al final en la prensa solo quedan los orujos.

Antes de comenzar la fase de fermentación se procede al *desfangado*, para que las partículas sólidas se depositen por decantación en el fondo del depósito.

La *fermentación*, que puede ser por las propias levaduras de la uva o levaduras añadidas, terminará de manera espontánea cuando el contenido en azúcar del mosto no sobrepasa los 4-5 g/L (vino seco), pero si se pretende obtener vinos más dulces hay que detener la fermentación previamente por métodos químicos (adición de anhídrido sulfuroso) ó físicos (enfriamiento o sobrecalentamiento). El control de la temperatura de fermentación, mantenida entre 18 y 22 ° C, determina la cantidad de azúcar que queda en el mosto. La fermentación se desarrolla en dos fases, una tumultuosa y otra rápida, y dura normalmente entre 10 y 15 días. Según el contenido de azúcar se distingue entre:

Vino seco: no tiene más de 5g/L

Vino semi-seco: entre 15-30g/L

Vino dulce: mas de 50g/L

Finalizada la fermentación se realizan *trasiegos* (dos o tres trasiegos entre los meses de noviembre y enero (en Europa)) para eliminar los residuos sólidos seguidos de una posterior etapa de *clarificación* (mediante sustancias clarificantes que arrastren los restos en suspensión que han escapado a los trasiegos) y *filtración*, con igual propósito que la clarificación se hace pasar el vino por un elemento poroso o una membrana.

VINIFICACIÓN EN TINTO.

Se realiza a partir del mosto de uvas tintas fermentado junto con las partes sólidas de la uva. A diferencia con los blancos, sobre la pasta resultante del estrujado se realiza el *despalillado* para separar el grano del raspón y así durante la maceración no se transmitan olores y sabores herbáceos desagradables al mosto.

Otra diferencia fundamental estriba en que en el vino tinto se llevan a cabo dos fermentaciones. La primera es al igual que el vino blanco, *la fermentación alcohólica*; durante esta fermentación se genera mucho gas carbónico que empuja los hollejos hacia la parte superior de la cuba formando una barrera natural (sombbrero), que se debe ir remojando con el mosto para activar la extracción de color (*remontado*).

Una vez conseguido el color, se procede al *descube*, separando la materia sólida del mosto el cual en este momento va a sufrir una segunda fermentación: *fermentación maloláctica*. Esta fermentación proporciona al vino unas propiedades organolépticas características, al transformar el ácido málico en ácido láctico.

Finalmente, tras las dos fermentaciones, el vino es sometido a diversos *trasiegos* y tratamientos de *clarificación y estabilización*, para posteriormente seleccionarlos por calidades y embotellarlos inmediatamente o proceder a crianza y envejecimiento.

La crianza en barricas de roble: se realiza para los vinos de mayor calidad a los que se les quiere dar una crianza. La elección del tipo de roble (americano o francés) y el tostado de las duelas es muy importante.

VINIFICACION EN ROSADO.

Es un proceso muy similar a la vinificación en blanco, con la principal diferencia de que se usa uva tinta o bien mezcla de blanca y tinta; y se emplean solamente mosto yema y mosto de primera prensada. Tras la eliminación del escobajo las uvas se estrujan y se trasladan a un depósito donde el mosto se somete a una corta maceración en frío con el hollejo, sin que llegue a fermentar. Pasado ese tiempo el mosto toma color, entonces se realiza el "*sangrado*" o separación del mosto y la pasta sólida.

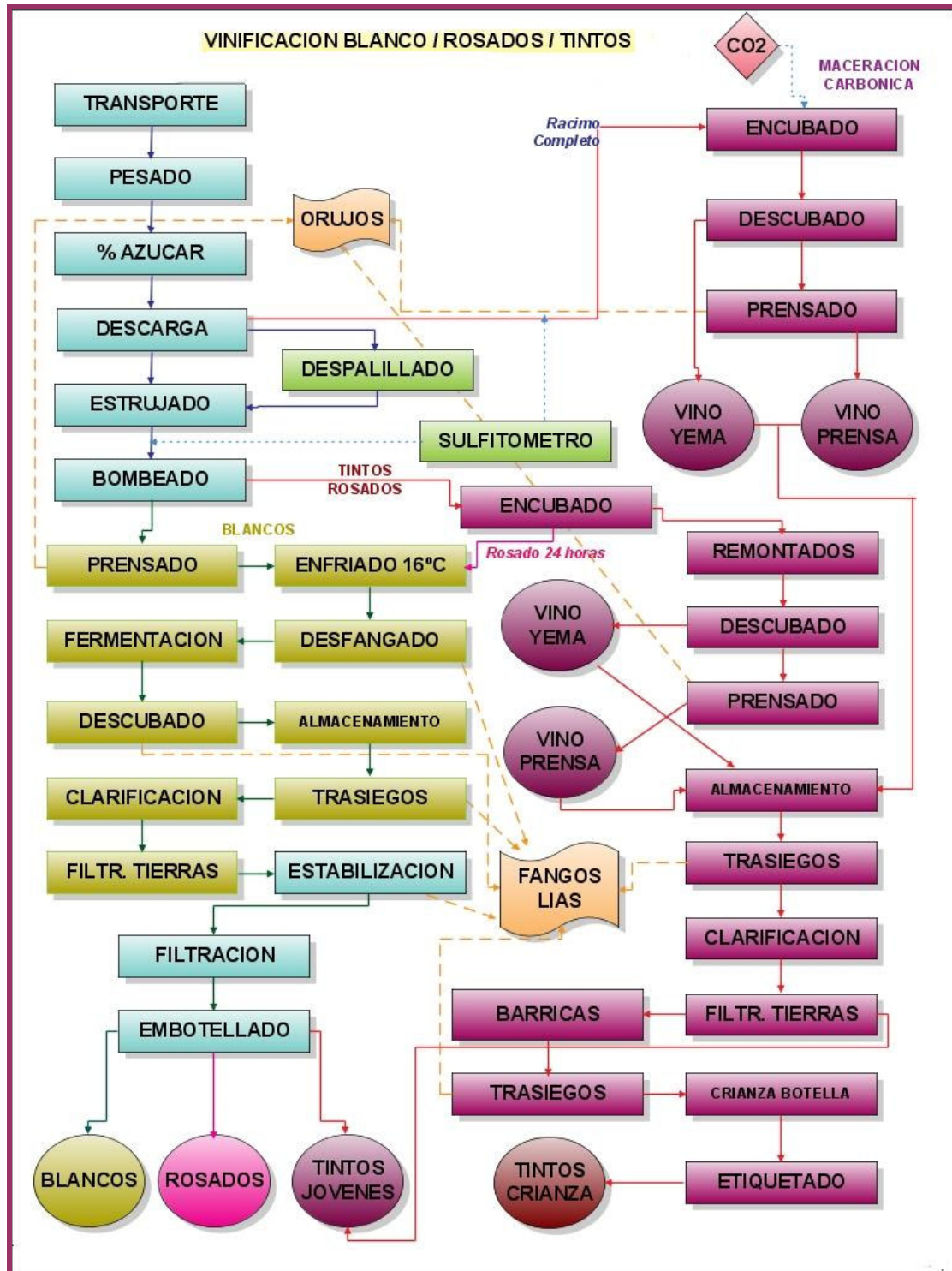
Antes de que comience la fermentación se realiza un ligero *desfangado*. Este desfangado se realiza igual que en la elaboración de los vinos blancos.

La fermentación, en virgen (sin hollejos), debe realizarse a temperatura controlada para obtener vinos frescos y afrutados; finalmente, a partir de este momento las operaciones a realizar son las mismas que las de vinificación en blanco.

En cuanto a su **composición general**, el vino es una solución hidroalcohólica, ácida, tamponada de más de 500 sustancias, minerales, orgánicas, en estado sólido, líquido, y gaseoso (más de un

centenar son volátiles y aportan aroma); es un producto de transformación de la materia vegetal viva por microorganismos, por ello su composición está ligada a diversos fenómenos bioquímicos.

Figura 1. Vinificación



Fuente: www.estudiaenologia.com

Los distintos componentes del vino tienen dos orígenes principales: un origen vegetal, pues proceden de la uva y se encuentran ya en el mosto; otro viene la fermentación alcohólica, proceso desarrollado por las levaduras y que básicamente consiste en la transformación de los azúcares de los mostos, en el alcohol y otros compuestos de los vinos. Un tercer origen que poseen algunos componentes de numerosos vinos son los derivados de la crianza en madera de roble y de su envejecimiento en botella, donde el vino continúa transformándose.

Gracias al gran desarrollo de las diferentes técnicas de análisis, principalmente cromatográficas, se han identificado hasta el momento más de 500 compuestos (Hidalgo Togores, 2003; Soleas, Diamandis, Goldberg, 1997) los cuales se pueden agrupar atendiendo a su participación en características sensoriales o caracteres gustativos del vino:

- Sustancias de gusto azucarado. El gusto azucarado no es exclusivo de azúcares. En este grupo se incluyen azúcares, polialcoholes (manitol) y alcoholes de origen fermentativo (etanol).
- Sustancias de gusto ácido. En este grupo se debe distinguir entre acidez fija (ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico y láctico) y acidez volátil (ácido acético).
- Sustancias de gusto salado. Sales de ácidos minerales y de algunos orgánicos.
- Sustancias de gusto amargo y astringente. Compuestos fenólicos.
- Otras sustancias. En este grupo se encuentran las sustancias nitrogenadas (proteínas, polipéptidos), Polisacáridos (pectinas), sustancias volátiles, vitaminas.

De todos estos compuestos los constituyentes principales y más importantes del vino (tabla 1), ya sea por razones tecnológicas, sensoriales, por calidad, por concentración son:

➤ *El Agua.* Es el principal constituyente, se encuentra en una concentración cercana al 85%. Su presencia es un factor crítico para que se produzcan las reacciones químicas involucradas en maduración de la uva así como en las diferentes fases de la posterior elaboración del vino.

Tabla 1. Principales componentes del vino^a.

COMPONENTE	CONCENTRACION (g/L) ^a
Agua	850-900
Alcohol	80-140
Polisacáridos	0.2-2
Compuestos fenólicos	0.1-2
Sustancias nitrogenadas	1-3
Otros ^b	0.7-3

^a Fuente: Waterhouse, 2002; Ferreira y col. 2002; Soleas y col. 1997. ^b Otros: ácidos, azúcares, sales, vitaminas

➤ **Azúcares.** Se distinguen principalmente hexosas, como glucosa y fructosa, y pentosas (arabinosa y xilosa). Los principales azúcares de la uva son glucosa y fructosa, y están en proporciones aproximadamente iguales, pero durante la fermentación la relación glucosa: fructosa disminuye, debido a que las levaduras fermentan especialmente la glucosa. En vinos totalmente fermentados apenas queda glucosa, pero sí una fracción de fructosa. En vinos tintos la glucosa libre que se pueda encontrar es debido a la hidrólisis de ciertos glucósidos en el transcurso de la fermentación.

Por otra parte, la uva posee una pequeña cantidad de azúcares no fermentables (pentosas como arabinosa y xilosa), así como la posible existencia de trazas de oligosacáridos, melibiosa, rafinosa, maltosa y galactosa. Raramente se encuentra sacarosa en uvas de *Vitis vinifera*.

➤ **Polisacáridos.** Se encuentran en cantidades variables, con un margen muy amplio desde 0.2g/l hasta 2g/l dependiendo de multitud de factores (variedad y madurez de la uva, vinificación). Son parcialmente solubles en agua y se extraen durante los procesos de prensado (Soleas y col., 1997). Tienen dos orígenes principales:

- a) De la pared celular de la uva provienen polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa, y polisacáridos pécticos como el ramnogalacturonano II (RGII).
- b) Procedentes de la pared celular de las levaduras aparecen manoproteínas en concentraciones que pueden alcanzar los 150mg/L.

➤ **Alcoholes.** Después del agua el etanol es el componente más importante. Si el grado alcohólico varía entre 9-15°, entonces el alcohol representa de 72- 120g/L. Los principales factores que controlan la producción de etanol son los azúcares, la temperatura, y las levaduras. El etanol es crucial en la estabilización, envejecimiento y propiedades sensoriales del vino. Durante el proceso de fermentación de las uvas tintas, el etanol actúa como un solvente de extracción de pigmentos y taninos, y es esencial en la formación de compuestos volátiles producidos durante la fermentación y formados durante el envejecimiento en barricas de roble (Soleas y col., 1997).

El metanol es un constituyente minoritario (0.1-0.2g/L) y suele aparecer debido a la degradación de las pectinas. Otros alcoholes que aparecen debido a la fermentación son el glicerol (5-10g/L), butilenglicol (0.3-1.5g/L).

➤ **Compuestos Fenólicos.** El vino contiene cantidades relativamente altas de *compuestos fenólicos* de estructuras variadas que proceden casi exclusivamente de la uva, excepto en vinos envejecidos en barrica, que incluyen en su composición compuestos fenólicos derivados de la madera de

roble (Singleton, 1995, Moutounet y col, 1989) . Las semillas, hollejos y raspones son ricos en flavonoides, mientras que en la pulpa se encuentran los no flavonoides. Estos compuestos son de gran importancia en enología. ,contribuyen a las propiedades sensoriales (color, astringencia), tecnológicas (formación de agregados coloidales por interacción con proteínas), nutricionales y beneficiosas para la salud (problemas cardiovasculares, efecto antioxidante, enfermedades neurodegenerativas). Su concentración en vinos blancos y rosados es más baja que en los tintos (tabla 2).

La comparación de la composición fenólica de la uva y del vino muestra que junto a las moléculas procedentes de la baya, aparecen en el vino otros fenoles surgidos por reacciones de los compuestos originales de las diferentes etapas fermentativas; pero todos aportan importantes características al vino: contribuyen a la astringencia, dan color al vino (tinto), son factor crítico en la conservación del vino debido a sus propiedades antioxidantes.

Tabla2. Composición fenólica típica^a de vinos blancos y vinos tintos

COMPUESTO FENOLICO (mg/L)	TIPO de VINO	
	BLANCO	TINTO
Ac. Hidroxidroxibenzóicos	130-154	60-165
Ac. Benzoicos	10-15	60
Taninos Hidrolizables	0-100	0-250
Estilbenos	0.5	7
Flavan-3-ol	15-25	100-200
Proantocianidinas	20-25	750-1000
Flavonoles	---	100
Antocianinas	---	90-400

^a Fuente: Waterhouse, 2002

Los polifenoles y compuestos relacionados proceden de la piel y semillas de la uva y en menor medida de los tallos de la vid, producidos por el metabolismo de las levaduras, o por procesos de extracción de la madera (Shahidi y Nacz, 1995; Mazza y col, 1999). Los dos grupos principales de compuestos polifenólicos que están presentes en las uvas y en el vino (Waterhouse 2002), son flavonoides y no flavonoides.

No flavonoides: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos benzoicos, taninos hidrolizables (proviene de la madera de la bodega, como el vescalagin), estilbenos (resveratrol). Los ácidos hidroxibenzóicos habitualmente se encuentran esterificados con azúcares.

Flavonoides: principalmente son flavan-3-oles (catequinas, epicatequinas, aunque la mayoría se encuentran en forma oligomérica como proantocianidinas), flavonoles (quercetina, rutina que provienen principalmente de la piel de la uva y se encuentran estrechamente relacionados con la exposición a la luz

solar) y antocianinas (como malvidin-3-glucósido, que aportan el color rojo al vino tinto, y pueden polimerizar al avanzar la “edad” del vino). La cantidad de flavonoides extraídos durante los procesos de vinificación está influenciada por muchos factores, tales como temperatura, tiempo de contacto con la piel de la uva, tipo de envase usado en el proceso de fermentación, concentración de etanol, SO₂, cepa de levadura, pH y enzimas pectolíticas.

➤ *Ácidos.* La acidez del vino está constituida por diversos ácidos orgánicos. Los ácidos los podemos dividir en dos grupos: procedentes de la uva (ácidos tartárico, málico y cítrico), y originados por la fermentación (ácidos succínico, láctico y acético), dando lugar a la acidez fija (ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico y láctico) y a la acidez volátil (ácido acético).

El ácido tartárico es específico de la uva y del vino, de él depende principalmente el pH del vino. De los tres ácidos de la uva es el más resistente a la acción de las bacterias de las levaduras, Mientras que tanto el ácido málico como el cítrico se fermentan en la denominada fermentación maloláctica.

El ácido acético, que da lugar a la acidez volátil es producto secundario tanto de la fermentación alcohólica como de la maloláctica. Si se encuentra en concentraciones superiores a 0.4g/l indica alteración bacteriana, aunque es fácilmente eliminable por destilación.

Otros ácidos que se encuentran en pequeñas cantidades son: galacturónico, glucurónico, glucónico, citramálico, dimetilglicérico, pirúvico, cetoglutárico, etc.

➤ *Sustancias nitrogenadas.* Estas sustancias apenas influyen en el sabor pero son indispensables para el metabolismo de bacterias y levaduras. Además de la forma amoniacal, el nitrógeno se puede encontrar en mostos y vinos como:

a) *Proteínas.* Es la sustancia nitrogenada más importante. Estos polimeros se encuentran en una concentración de 15-230mg/L (Ferreira y col. 2002), siendo de gran importancia tecnológica debido a su influencia en los procesos de clarificación y estabilización del vino.

Desde hace tiempo se ha considerado *la proteína* del vino como una compleja mezcla de proteínas de dos fuentes bien diferenciadas: proteínas de la uva y proteínas de las levaduras. Las levaduras afectan a la composición proteica del vino de varias maneras, transfiriendo sus propias proteínas al vino durante la autólisis y/o presencia de enzimas exocelulares de las levaduras que pueden hidrolizar proteínas presentes en el vino,

liberando péptidos (Ferreira y col, 2002); Sin embargo posteriores estudios demostraron que la gran mayoría de proteínas del vino provienen casi exclusivamente de la pulpa de la uva.

La vinificación es un proceso que combina bajo pH (3-3.8) con una elevada actividad proteolítica, por lo que las únicas proteínas que finalmente quedan en el vino serán las derivadas de la uva, (proteínas inducidas por patógenos ó PR) y trazas de aquellas que se deben a las levaduras (como las proteínas glicosiladas, manoproteínas).

Se piensa que la desnaturalización lenta de las proteínas conduce a la agregación, a la floculación con la consiguiente turbidez y a la formación de un precipitado proteico. La mayor parte de las proteínas que provocan turbidez en los vinos tienen su origen en las uvas y presentan puntos isoeléctricos y pesos moleculares bajos. Son proteínas inducidas por patógenos (pathogenesis-related, PR) de la uva que aparece después del envero, durante la maduración, y son muy resistentes a los pH bajos y a la proteólisis enzimática o no-enzimática.

Las Principales PR de la uva que podemos encontrar en el vino son quitinasas y otras con una estructura similar a las taumatinas (Peng y col, 1997). Ésta última, es una proteína de pequeño tamaño, que posee una secuencia de aminoácidos similar a la taumatina, (proteína extraída de un arbusto de África Oeste llamado katemfe empleado como sustitutivo natural del azúcar, 3000 veces más dulce que éste); mientras que las quitinasas pueden existir en el vino en dos formas (Ia y Fa) (waters, 1996) y tienen propiedades antifúngicas .

a) Péptidos y aminoácidos.

➤ **Sales.** Aportan gusto salado. El vino contiene de 2 a 4 g/L. Son las sales de los ácidos minerales y de algunos ácidos orgánicos, tales como fosfato, sulfato, cloruro, sulfito, tartrato, , lactato, potasio, sodio, magnesio, calcio, hierro, etc.

2. HIDRATOS DE CARBONO Y FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE.

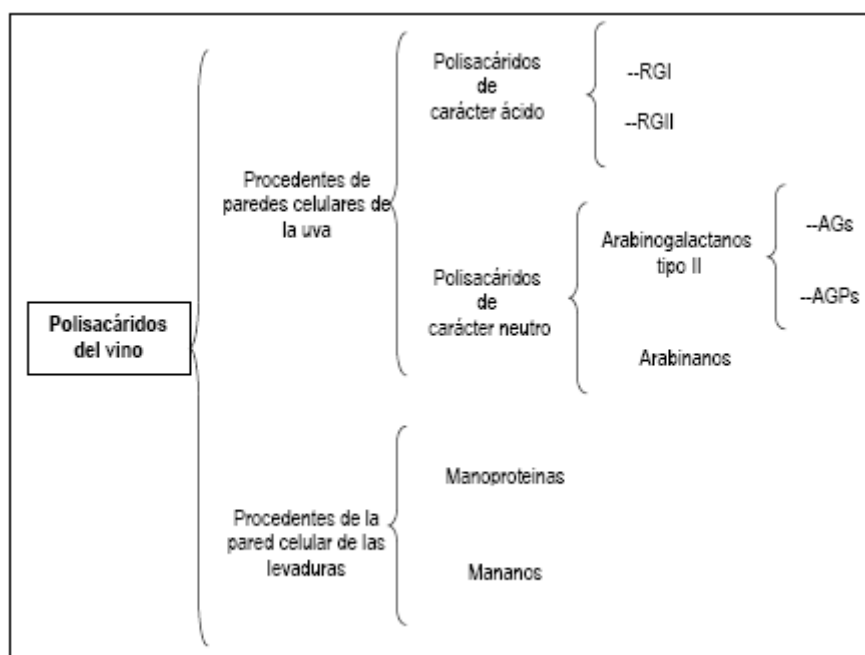
Polisacáridos, polifenoles y proteínas son los principales grupos de macromoléculas que podemos encontrar en el vino.

Los polisacáridos del vino están involucrados en multitud de fenómenos enológicos. Su principal contribución es a la estabilidad del vino. Desde un punto de vista tecnológico se pueden considerar

“coloides protectores”: previenen formación de turbios al interaccionar con los polifenoles (Riou y col 2002), contribuyendo de este modo a la estabilidad proteica (floculación proteínas), también evitan o retrasan quiebra tartárica, así como son capaces de actuar como agentes quelantes de cationes divalentes (O'Neill y col. 1996). Mientras que, desde punto de vista organoléptico influyen en otras características y/o propiedades del vino, como formación y estabilización de la espuma. López-Barajas y col. (2001) describieron cómo los polisacáridos de tamaño molecular superior a 3000 influían en la formación de la espuma, mientras que los de inferior tamaño molecular contribuían a su estabilización. También contribuyen al color y al aroma (Dufour y Bayonove, 1999).

Los polisacáridos se encuentran en el vino en unas concentraciones muy variables (0.2g/l- 2g/l). La concentración depende de muy diversos factores, como son, la variedad de la uva, su grado de maduración, el proceso de vinificación (Boulet, Williams, Doco 2007). Estos polisacáridos pueden tener dos orígenes (figura 2), la pared celular de la uva (76%-87%) ó provenir de la levadura (14-19% de los polisacáridos del vino)

Figura 2. Polisacáridos presentes en el vino

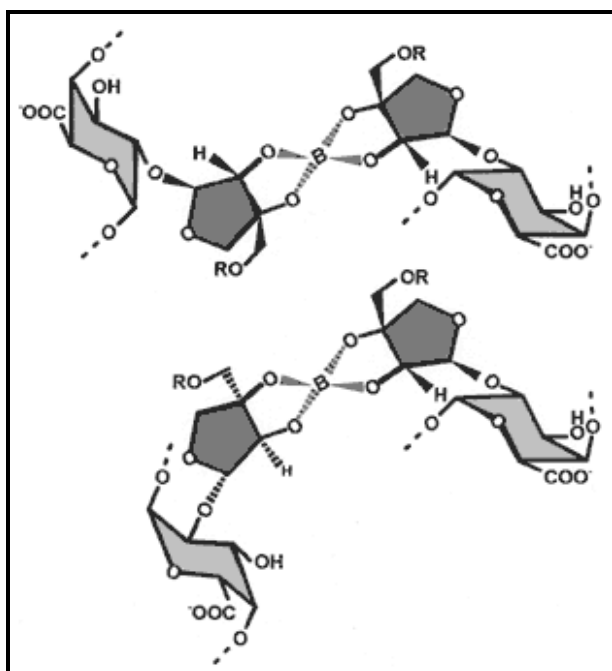


➤ **Los polisacáridos procedentes de las uvas pueden tener carácter ácido ó bien carácter neutro.** Entre los polisacáridos ácidos destacan el Homogalacturonano (HG), Ramnogalacturonano I (RGI) y Ramnogalacturonano II (RGII). Sin embargo durante las primeras etapas de la vinificación las zonas lisas de las pectinas son rápidamente degradadas, liberando RG I y RG II haciendo desaparecer el HG y degradando en gran medida el RGI, por lo que en vino sólo se han detectado débiles cantidades de RG I (inferiores a 20mg/L) (Pellerin y col 1995). En definitiva, el polisacárido ácido mayoritario procedente de la uva sería el RG II.

El Ramnogalacturonano II es un polisacárido péctico (ver capítulo I. Introducción), de bajo peso molecular (5-10KDa). Puede encontrarse como monómero o en forma de dímero (figura 3). Su abundancia y la resistencia a las degradaciones enzimáticas lo convierten en uno de los polisacáridos principales del vino. Su concentración va aumentando durante las etapas de maceración de la uva, por lo que es más abundante en vino tinto (80-120mg/L), que en los vinos blancos donde raramente sobrepasa los 30mg/L (Pellerin y O'Neill 1998, Doco y col 1995, Doco y col 1996).

Las condiciones de conservación de los vinos, principalmente el pH, son factores decisivos para que el RGII se encuentre como dímero (figura 2) formando uniones éster de borato-diol con los residuos de apiosa. Estudios realizados por Pellerin y O'Neill en 1998 demuestran cómo el RGII aparece en el vino tinto, casi exclusivamente en forma de dímero (peso molecular de 10000Da), influenciado fundamentalmente por el pH=3.5.

Figura 3. Ramnogalacturonano II en forma de dímero (como aparece en vino tinto)



Fuente: www.Ccrc.uga.edu

Entre los polisacáridos neutros se incluyen polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa, como arabinogalactanoproteínas (AGP) y arabinanos (Brilluet y col. 1990; Pellerin y col 1995). Los AGP son los mayoritarios y representan aproximadamente el 40% de los polisacáridos del vino (Pellerin y col 1995).

Los arabinogalactanos (AGs) y (AGPS) tipo II forman uno de los grupos más abundantes entre los poliosidos de los mostos y del vino. Son los responsables de la predominancia de galactosa y arabinosa como constituyentes de los polisacáridos del vino.

Los arabinogalactanos de tipo II comprenden dos tipos de moléculas: los AGs son polisacáridos pépticos en sentido estricto, mientras los AGPs son proteoglicanos.

Los AGPs representan aproximadamente el 40% de los polisacáridos del vino tinto (Pellerin y col 1995). Están compuestos por la unión covalente entre un AG y un péptido rico en hidroxiprolina (Pellerin y col 1993), aunque también puede contener otros aminoácidos (glicina, serina, y alanina).

➤ **Los polisacáridos procedentes de las paredes celulares de las levaduras** son principalmente manoproteínas y en menor medida mananos. Las manoproteínas, están formadas por al menos un 10% de proteína y cadenas glicánicas constituidas mayoritariamente por manosa. Estas sustancias se encuentran en los vinos en unas concentraciones de 14-19%..

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* está constituida por manoproteínas entrecruzadas por glucanos y cutina (Palomero y col, 2007). Durante fermentación y autólisis (maduración sobre lías), la pared celular se degrada gradualmente. A consecuencia de esta degradación la pared celular pierde rigidez, liberándose los polisacáridos.

En los vinos existen dos tipos de manoproteínas que se pueden diferenciar según su origen o modo de obtención: manoproteínas excretadas durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (que se acumulan durante la fermentación) (Llauberes, 1987) y manoproteínas liberadas durante la autólisis celular de las levaduras que se produce durante el almacenamiento o maduración del vino sobre las lías.

3. COMPLEJO DE FIBRA DIETÉTICA: POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES Y COMPUESTOS ASOCIADOS.

Numerosos estudios han descrito el importante papel de los polisacáridos del vino. Las manoproteínas son capaces de intraccionar con los compuestos volátiles del vino, ayudan al crecimiento de bacterias malolácticas, contribuyen a la estabilidad del vino blanco frente a quiebra proteica y tartárica, disminuyen astringencia debida a taninos (Caridi, 2006; Gonçalves y col. 2002), los AGPs actúan evitando floculación de las partículas en suspensión del vino (Doco y col 2007), El RGII actúa como quelante formando complejos con cationes divalentes y trivalentes, incluyendo el plomo. (Doco y col 2007).

La importancia de los polisacáridos del vino se ve reflejada en la gran cantidad de estudios publicados hasta la fecha, pero del mismo modo, la mayoría de estas investigaciones se centran en las propiedades sensoriales (aroma) y tecnológicas (estabilización, clarificación) que estos polisacáridos son

capaces de aportar ; mientras que es de destacar la escasez de trabajos acerca de estos compuestos desde punto de vista nutricional.

El concepto de carbohidratos no digeribles del vino como fibra soluble es relativamente nuevo, hasta la fecha pocos estudios se han publicado centrados en este concepto (Díaz-Rubio y Saura-Calixto, 2006). Por ello es necesario obtener mas información, no solo de la composición de esta fibra, si no tambien de sus propiedades fisiológicas y nutricionales, Así como de la posible existencia de un complejo fibra dietética formado por POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES(fibra propiamente dicha) -POLIFENOL-PROTEINA.

La mayor parte de **las proteínas** que provocan turbidez en los vinos tienen su origen en las uvas y presentan puntos isoeléctricos y pesos moleculares bajos. Son proteínas inducidas por patógenos (pathogenesis-related, PR) de la uva que aparece después del envero, durante la maduración, y son muy resistentes a los pH bajos y a la proteólisis enzimática o no-enzimática. Por otra parte existe un segundo grupo de proteínas, las glicoproteínas (arabinogalactanoproteínas), que incluyen aproximadamente un 10% de proteína en su composición, siendo proteínas ricas en hidroxiprolina o serina; estos proteoglicanos proceden de las paredes celulares de la uva y son liberadas durante la fermentación por enzimas pectolíticas endógenas.

Entre los principales grupos fenólicos que podemos distinguir en el vino se encuentran: compuestos flavonoides y no flavonoides.

Entre los No flavonoides cabe destacar la presencia de resveratrol, y los ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos; estos últimos son mayoritarios en vinos blancos. Ambos grupos de ácidos se encuentran en forma glicosilada no solo en vino, si no en general en todos los alimentos (Manach y col. 2004), aunque concretamente los ácidos hidroxicinámicos son fácilmente hidrolizables.

Los derivados del ácido hidroxicinámico se encuentran normalmente esterificados con azúcares, ácidos orgánicos o diferentes alcoholes. Los vinos envejecidos en barricas de roble tienen elevados contenidos de derivados del ácido hidroxibenzoico, especialmente ácido elágico, el cual procede de la rotura de taninos hidrolizables, los cuales son polímeros de ácido elágico, o ácidos gálico y elágico, con glucosa. (Waterhouse, 2002).

Por otra parte entre los flavonoides encontramos flavan-3-oles (catequinas, epicatequinas, aunque la mayoría se encuentran en forma oligomérica como proantocianidinas), flavonoles y antocianinas (como malvidin-3-glucósido, que aportan el color rojo al vino tinto, y pueden polimerizar al avanzar la “edad” del vino). La cantidad de flavonoides extraídos durante los procesos de vinificación está

influenciada por muchos factores, tales como temperatura, tiempo de contacto con la piel de la uva, tipo de envase usado en el proceso de fermentación, concentración de etanol, SO₂, cepa de levadura, pH y enzimas pectolíticas. Finalmente, la extracción está limitada por la cantidad de flavonoides presentes en la uva, y de los procesos de vinificación, así como la estructura del compuesto fenólico.

Las catequinas y epicatequinas que no se encuentran en forma oligomérica, se encuentran libres, es decir no forman glicósidos, aunque los ésteres que pueden formar con ácidos fenólicos (epicatequin galato) si pueden encontrarse glicosilados (Monagas y col. 2005); sin embargo es común que los flavonoles como quercetina y rutina formen glicósidos con galactosa, glucosa, arabinosa, ramnosa)(Monagas y col 2005)

Las antocianidinas del vino igualmente aparecen en forma de glucosidos. Concretamente son - O- monoglicosidos o 3- O- monoglicósidos acetilados de delfinidina, cianidina, malvidina, peonidina o petunidina. Durante vinificación estos compuestos sufren diversas reacciones de oxidaciones hidrólisis y condensación.

En consecuencia es de suponer que los polisacáridos no digeribles o FDS, así como la proteína sean las principales macromoléculas capaces de unirse a polifenoles. Los flavan-3-oles y más concretamente los taninos condensados son los compuestos fenólicos que pueden unirse con las proteínas del vino generando turbidez, coloides, y produciendo atringencia del vino (Vidal y col. 2004) mientras que los ácidos fenólicos y flavonoles suelen aparecer glicosilados, con diversos monosacáridos. Por tanto es coherente pensar que si estos monosacáridos se encuentran cuantificados como parte de los polisacáridos de la FDS del vino, los compuestos fenólicos que estén unidos a ellos, también lo sean.

La mayor parte de la proteína del vino debe ser hidrolizada, durante el análisis, a aminoácidos o péptidos mediante tratamiento enzimático con pepsina; mientras que los polisacáridos constituyentes de la fibra, no son atacados por las enzimas. Sin embargo cierta cantidad de proteína se considera no digestible puesto que resiste la hidrólisis enzimática, o bien, por que debido a su unión con los PS de la fibra, (AGP, Manoproteínas o interacciones generadas para evitar la formación de agregados taninos-proteína) se dificulta el acceso de las enzimas a los enlaces pépticos.

Por ello otro de los objetivos de este trabajo ha consistido en determinar la presencia de los compuestos fenólicos asociados y su capacidad antioxidante así como la existencia de proteína unida a la fibra, y por tanto no digerible por el organismo.

II MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS.

Para llevar a cabo este estudio, se analizaron diferentes vinos (tabla 3). Son vinos de diferentes Denominaciones de Origen, tintos y blancos; escogidos por su mayor consumo en la dieta española.

Tabla 3. Vinos analizados

TIPO DE VINO	DENOMINACIÓN DE ORIGEN	NOMBRE	AÑO	TIPO UVA	% ALCOHOL
Tinto	Ribera de Duero	Mayor de Castilla	Cosecha 2001	Tempranillo	12,5
	La Mancha	Señorío de Guadianeja	Crianza 2000	Tempranillo Merlot	12,5
	Rioja	Marqués de Griñón	Cosecha 2001	Tempranillo	12,5
	Jumilla	Castillo San Simón	Crianza 2000	Tempranillo Monastrell	12,5
			Crianza ^a 2001	Tempranillo Monastrell	12,5
	Penedés	Jaume Serra	Crianza 2000	Cabernt S. Merlot Tempranillo	12
Blanco	Rueda	Solar de la Vega	Cosecha 2003	Viura Verdejo.	13
	La Mancha	Monte Don Lucio	Cosecha 2003	Macabeo (Viura)	11

^a Vino empleado solo para los análisis complementarios.

2. REACTIVOS Y EQUIPOS ESPECÍFICOS.

- Compuestos fenólicos empleados como patrones en hidrólisis ácida :Acido Gálico (G-7384, Sigma), Catequina (C-1251, Sigma), Acido cafeico (C-0625, Sigma), Rutina (R-5143, Sigma),Cianidina (Extrasynthese).
- Disolución de mezcla de patrones fenólicos: ácido gálico (95mg/L); ácido cafeico (8mg/l), catequina (190mg/L), quercetina (10mg/L) y delfinidina (25mg/L). Todos los patrones son de Sigma, excepto la delfinidina (Extrasynthese. (Genay, France)
- Acido Sulfúrico (96%) (Panreac).

- Bolsas de diálisis: membranas de celulosa con punto de corte para peso molecular 1000Da; 3500Da; 7000Da; 12000-14000 Da. Dialysis Tubing Visking, 9-32-36 mm (Medicell International, Ltd).

3. METODOS

Para la determinación de la Fibra dietética soluble se ha empleado el método descrito en capítulos anteriores. Este método incluía 4 pasos fundamentales: preparación de la muestra (concentración), tratamientos enzimáticos, diálisis y finalmente la determinación de la fibra dietética soluble (Saura-Calixto et al. 2002; Díaz-Rubio & Saura-Calixto 2006).

3.1 Tests y análisis especiales.

3.1.1. Análisis para elucidar si el Ramnagalacturonano II forma parte de la fibra dietética del vino (aplicable a otras bebidas que contengan este polisacárido).

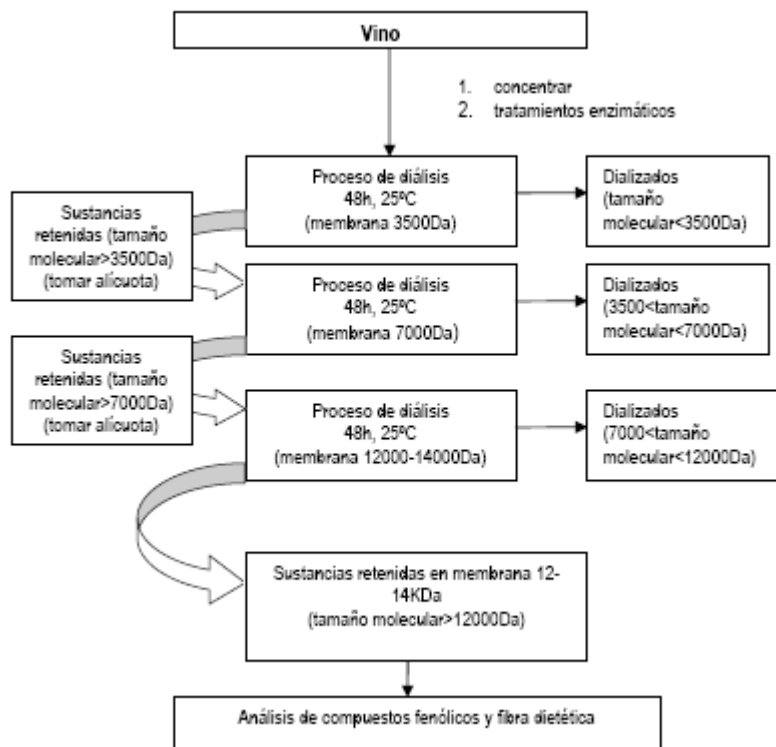
Para comprobar este hecho se realizaron análisis complementarios empleando membranas con diferentes tamaño de poro y por tanto dividiendo los polisacáridos en fracciones de diferentes Pm.

Este análisis consistió básicamente en un proceso de diálisis en cadena. Tras los tratamientos enzimáticos, la muestra se introdujo en una membrana de tamaño de poro de 3500Da, de la cual se llevó a una membrana de 7000Da, para finalmente introducir los polisacáridos que permanecían en esta membrana, en otra, pero esta vez de 12000-14000Da. De cada paso se fueron tomando alícuotas para determinar la FDS. (figura 4).

En este diseño experimental, el vino sufre los mismos tratamientos de concentración y digestiones enzimáticas, que los empleados de manera habitual para aislar el complejo de FDS, sin embargo el proceso de diálisis difiere, al realizarse una diálisis seriada empleando diferentes tipos de membrana de diálisis.

Tras cada proceso de diálisis se tomó una alícuota para realizar los análisis pertinentes, y finalmente tras la última diálisis (con la membrana habitual) se tomaron las disoluciones retenidas (compuestos de tamaño molecular mayores de 12000kDa) se enrasaron a 100ml y se llevaron a cabo las determinaciones de fibra dietética soluble (espectrofotométricamente) y de compuestos fenólicos.

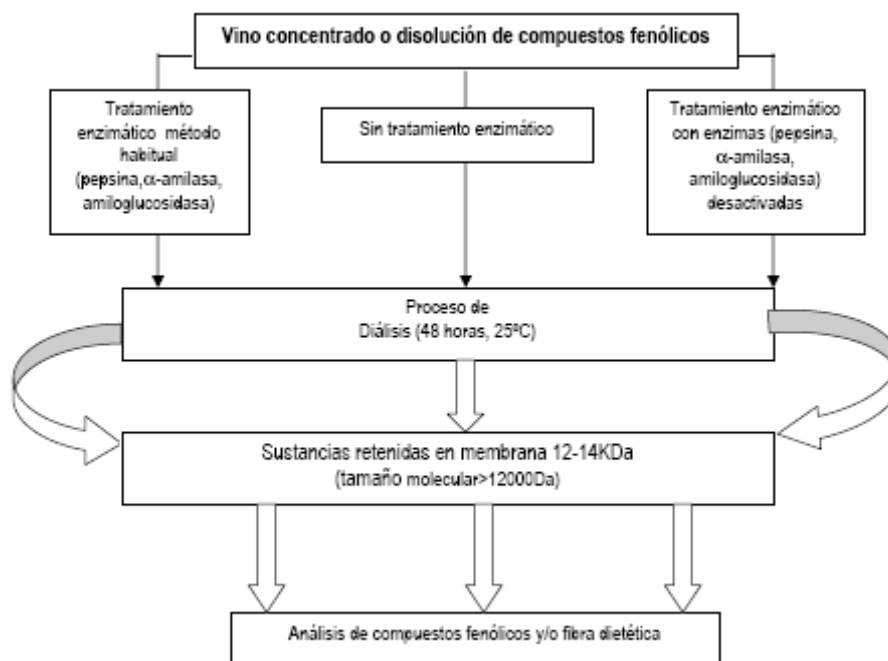
Figura 4. Análisis para elucidar si el Ramnogalacturonano II forma parte de la FDS del vino



3.1.2. Análisis para comprobar la posible influencia de las enzimas en los resultados. Demostrar que los compuestos fenólicos del complejo de FDS del vino están asociados a la fibra y no se encuentran interaccionando con enzimas. (aplicable a otras bebidas)(figura 5).

Las enzimas tienen naturaleza proteica, por lo que podrían interaccionar con los compuestos fenólicos, o con otros compuestos por lo que no atravesarían la membrana generando resultados engañosos al cuantificar los polifenoles por el método Folin-Ciocalteu (Singlton y Rossi, 1965). Por ello se preparó una disolución patrón compuesta por polifenoles que normalmente se encuentran en los vinos (ácido gálico, ácido cafeico, catequina, quercetina y delphinidina). Sobre alícuotas de esta disolución se realizaron diversos tratamientos: se realizó una diálisis sin tratamiento enzimático previo, diálisis tras un tratamiento con enzimas desactivadas y finalmente un tercer tratamiento que consistió en la aplicación estandarizada del tratamiento enzimático normal que se emplea para aislar y determinar la fibra en las bebidas.(ver capítulo metodología)

Figura 5 Análisis para demostrar que los compuestos fenólicos del complejo de FDS del vino están asociados a la fibra



Se realizan tres tipos de tratamientos diferentes:

- El tratamiento enzimático habitual (pepsina, α -amilasa y amiloglucosida)
- Tratamiento con enzimas (pepsina, α -amilasa y amiloglucosida) desactivadas. Para ello, previo a su incorporación a la muestra, las enzimas son sometidas a condiciones de temperatura extremas, que aseguren su inactivación y/o desnaturalización ($T^a = 100^{\circ}\text{C}$ durante 5 min).
- Sin ningún tipo de tratamiento enzimático. Simplemente se mantuvieron las mismas condiciones de pH.

El siguiente paso consistió en dializar cada una de estas muestras (por triplicado), durante 48h a 25°C . Al terminar el proceso, las disoluciones retenidas en el interior de cada bolsa se enrasaron a 100ml y se realizaron los análisis pertinentes: determinación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y proteína (método Bradford).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. FIBRA DIETETICA SOLUBLE

De la tabla 4 se deduce que el vino (fundamentalmente el vino tinto), tiene una cantidad apreciable de fibra dietética, es decir, los polisacáridos y por ende la FDS, probablemente sean el

tercer constituyente mas importante del vino tinto, solo superado por el agua y el alcohol (Boulet, williams y Doco, 2007).

La concentración de fibra soluble en el vino tinto (0.94g/L-1.37g/L) es superior a la encontrada en vinos blancos (0.19-0.39g/L) (tabla 5), estas diferencias se deben principalmente a las diferentes técnicas de vinificación. La FDS procede de los polisacáridos solubles de las uvas y en menor medida de las levaduras. En el proceso de vinificación en tinto, la fermentación se realiza a partir del mosto de uvas tintas, fermentado junto con las partes sólidas de la uva; esto va a permitir la solubilización de una parte significativa de la FDS de la piel y semilla de la uva. Sin embargo en la vinificación en blanco no se lleva a cabo tal proceso de maceración.

De los vinos tintos, el vino con mayor FDS es el procedente de la D.O. Jumilla (1.37g/l) y el que tiene menor cantidad es de la D.O. La Mancha (0.94 g/L). Esto es debido en primer lugar a la variedad de la uva, al proceso de vinificación en tinto propio de cada Denominación de Origen y en menor medida también al grado de maduración de la uva, y factores culturales. Ortega-Regules y col. (2006) describieron las diferencias en la concentración de polisacáridos y azúcares neutros no celulósicos así como proteína y polifenoles de distintas variedades de uva, en incluso aún siendo la misma variedad pero procedentes de diferentes localizaciones geográficas.

Comparando los resultados de la FDS y las diferentes variedades de uva de los vinos, parece claro que la uva Tempranillo es la principal responsable de los contenidos más altos de fibra (1.37 g/L en la D.O. Jumilla, 1.14 g/L en la D.O la Mancha).

De los vinos blancos encontramos mayor FDS en el vino D.O. La Mancha(0.39g/L), elaborado con variedad de uva Macabeo.

No obstante, este estudio no se centra en la diferente concentración de fibra debido a factores culturales, el objetivo primordial de este trabajo consistió la determinación de Fibra, tomando como referencia vinos comerciales representativos del consumo en España

Tabla 4 Fibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles) del vino. Cuantitativa y cualitativamente

	Denominaciones de Origen Vino Tinto					Denominaciones de Origen Vino Blanco	
	Ribera de Duero	La Mancha	Rioja	Jumilla	Penedés	La Mancha	Rueda
FDS (g/250ml ^a)	0.28±0.002	0.235±0.002	0.285±0.001	0.342±0.002	0.315±0.0004	0.097±0.0007	0.047±0.002
FDS (g/L)	1.13±0.01	0.94±0.01	1.14±0.004	1.37±0.01	1.26±0.02	0.39±0.003	0.19±0.002
COMPOSICION FDS							
Ac. Urónicos (g/L)	0.1172±0.00007	0.1454±0.0006	0.169±0.0001	0.172±0.012	0.1371±0.005	0.103±0.0001	0.062±0.0001
Az. Neutros (mol%)							
Glucosa	19.14±4.8	17.91±0.45	13.53±2.4	16.04±0.305	24.59±0.31	3.73±0.33	10.51±0.75
Galactosa	22.41±3.06	21.66±0.48	25.54±3.09	27.15±0.44	17.45±0.29	30.92±0.19	27.45±3.89
Manosa	33.56±5.07	29.46±0.51	28.97±4.47	32.19±1.18	42.53±3.97	26.36±0.49	41.97±3.25
Xilosa	4.02±0.38	3.77±0.19	3.04±0.59	3.14±0.42	1.46±0.09	1.69±0.139	4.59±0.43
Arabinosa	18.98±1.86	25.15±1.66	28.09±5.7	20.78±1.16	12.86±0.25	35.79±0.23	15.002±0.69
Fucosa	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas	trazas
Ramnosa	1.13±0.20	0.89±0.02	0.97±0.28	0.84±0.01	1.22±0.026	0.462±0.003	0.903±0.07

^a volumen típico de una copa de vino

Los monosacáridos y ácidos urónicos, constituyentes de los polisacáridos que forman parte de la FDS en el vino se muestran en la tabla 4. Manosa (28.97- 42.53 mol%), galactosa (17.45-27.15 mol%) y arabinosa (12.86-28.09 mol%) son los monosacáridos mayoritarios tanto en el vino tinto como en el vino blanco (manosa: 26.36-42 mol%; galactosa: 30.92-27.45 mol%; arabinosa: 35.8-15 mol%) (Figura 6,7). Esto indica que los principales polisacáridos que constituyen la FDS son AGs y manoproteínas (MPs).

También se observan cantidades significativas de glucosa (13.5-25 mol%), que podrían indicar la presencia de hemicelulosas de estructura similar a las que se han descrito en la mezcla de orujos que se obtiene como residuo durante la vinificación (Bravo y Saura-Calixto, 1998). También Pellerin y col. (1995), publicaron un estudio en el cual describían la presencia de xiloglucanos (hemicelulosas) unidas a AGs o RG tipo I ó tipo II, a través de ésteres de ácido ferúlico.

Figura 6. Cromatograma de los azúcares neutros de la FDS de vino tinto

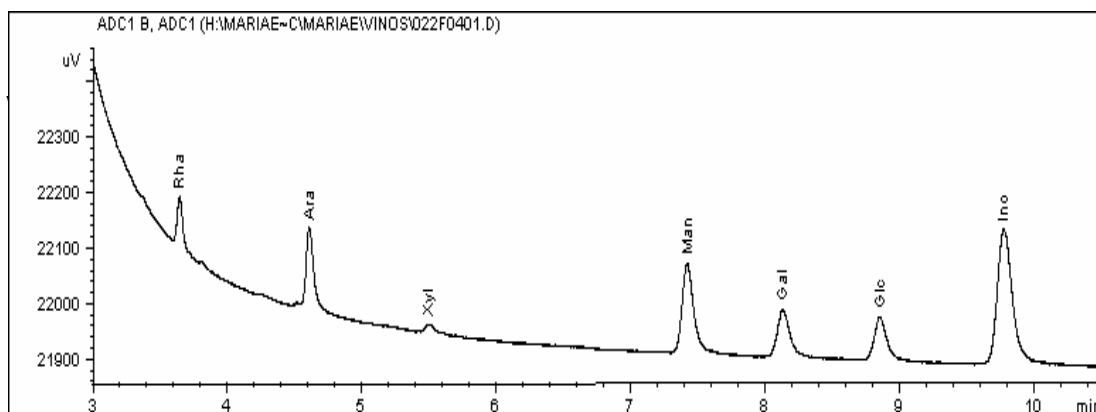
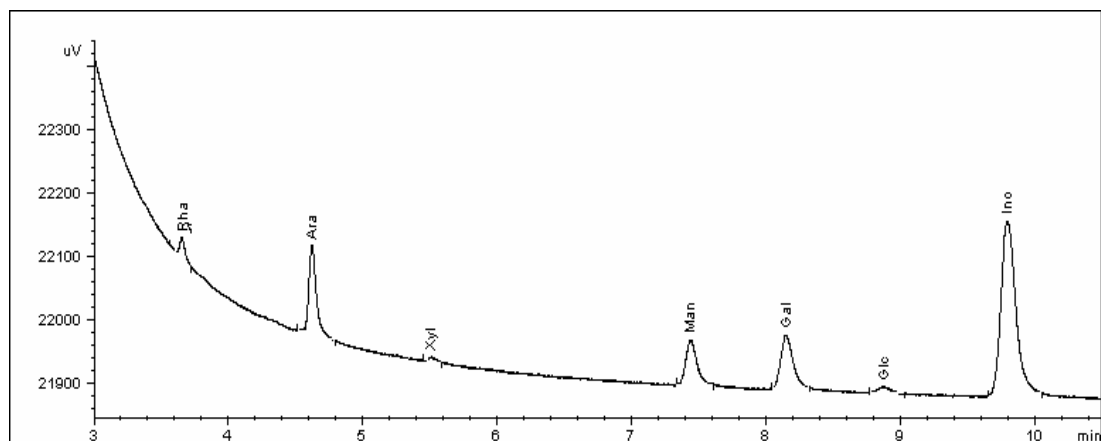


Figura 7. Cromatograma de los azúcares neutros de la FDS de vino blanco



Los resultados mostrados en esta memoria concuerdan con los obtenidos por este laboratorio al analizar orujo de uva tinta (Bravo y Saura-Calixto, 1998). En este orujo tan solo se detectaban pequeñas cantidades (trazas) de FDS, constituida mayoritariamente por ácidos urónicos procedentes de sustancias pécticas, como RGII, que se encuentran fuertemente unidas a hemicelulosas

El vino tinto presenta una mayor concentración de ácidos urónicos que el vino blanco, lo que indica mas sustancias pécticas en su FDS. en la elaboración del vino tinto se produce un proceso de maceración del vino con los orujos que no tiene lugar en la elaboración del vino blanco, por lo que la concentración de sustancias pécticas será mayor en el vino tinto.

En todas las determinaciones la concentración de azúcares neutros es mayor que los ácidos urónicos, indicando que las sustancias pecticas mayoritarias son las denominadas "rugosas", formadas mayoritariamente por azúcares neutros (arabinosa, galactosa, xilosa), en detrimento de los ácidos urónicos (Ward y Moo-Young, 1989)

Los constituyentes de la FD se consideran normalmente polisacáridos de elevado peso molecular (Pm), por lo que se emplean membranas de 12-14 KDa en el análisis (Miller y col 1981, Eastwood, 1987; Mañas y Saura-Calixto 1995). Sin embargo en los últimos años se ha sugerido la presencia de oligosacáridos y otros polisacáridos de bajo Pm como constituyentes de la FDS, por lo que se han propuesto métodos de análisis específicos (Prosky 1999).

En el caso del vino la duda surge como consecuencia de la presencia del RGII en el vino tinto cantidades apreciables (Pellerin y col. 1995). Este polisacárido suele encontrarse en el vino en forma de dímero (Pm de aproximadamente 10KDa) representando el 40% de los polisacáridos solubles del vino. Es resistente a la acción enzimática, por lo que es de esperar sea indigerible y forme parte de la FDS del vino. Es por esa razón que se realizó un análisis específico de "diálisis en cadena", cuyos resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Azúcares totales y polifenoles "retenidos" empleando "diálisis en cadena"

Tamaño Poro membrana (Da)	Vino Tinto D.O. Jumilla crianza 2002	
	Azúcares Totales(g/L)	Polifenoles Totales(g/L)
3500	1.7±0.06	1.09±0.07
7000	1.31±0.007	0.721±0.002
12000-14000	1.005±0.022	0.368±0.003
12000-14000 ^a	1.70±0.01	1.09±0.08

^a FDS del vino tinto D.O. Jumilla crianza 2001

Si comparamos los resultados obtenidos (tabla 6) en el segundo paso del análisis (membrana de 7000Da, 1.31g/L), con los polisacáridos cuyo Pm se encuentra comprendido entre 7000 y 12000 (0.305g/L) se deduce que el 20 % de los polisacáridos de la FDS van a tener un Pm entre 7000 y 12000; este valor se corresponde con los datos bibliográficos que indican que el RG II (Pm de 10KDa) puede alcanzar el 40 % de los polisacáridos del vino (Pellerin y col. 1995). Por tanto es coherente pensar que este 20% sea RGII que forma parte de la FDS del vino, aunque en pequeña concentración comparado con otros polisacáridos.

Del mismo modo estos resultados están en consonancia con los resultados obtenidos por cromatografía de gases, que indican presencia de ramnosa (monosacárido principal del RGII), aunque en pequeñas cantidades.

2. COMPUESTOS FENÓLICOS ASOCIADOS Y PROTEINA RESISTENTE.

En la tabla 6 se muestra el contenido total de compuestos fenólicos (método Folin Ciocalteu) de los vinos analizadas, así como la concentración de los grupos fundamentales (cromatografía líquida de alta eficacia, "CLAE" o "HPLC"). Estos resultados se correlacionan con los datos bibliográficos de diversos autores (Lamuela-Raventos y Waterhouse, 1994; Vrhovsek, y col. 2001; Waterhouse, 2002; De Beer y col., 2004), que mostraban mayor concentración de ácidos fenólicos en vinos blancos, mientras que en vino tinto los fenoles mayoritarios son los flavonoides.

Aunque los datos cuantitativos obtenidos espectrofotométricamente (método Folin Ciocalteu) no son comparables con CLAE (De Beer y col 2004; Robbins y Bean 2004), en este caso las diferencias podrían ser provocadas no solo por las diferentes interferencias del método espectrofotométrico, si no posiblemente por la presencia de fibra en vino.

El método Folin -Ciocalteu cuantifica todos los compuestos fenólicos, aquellos que se encuentran libres y los que se puedan encontrar asociados con diferentes macromoléculas, mientras que los métodos cromatográficos como CLAE solamente determinan polifenoles libres.

La concentración de polifenoles totales en el vino tinto es mayor (1857-1490 mg/L) que en el vino blanco (260-277 mg/L). En vino tinto son mayoritarios los flavonoides (catequinas, proantocianidinas, antocianinas, flavonoles), mientras que en vino blanco son mayoritarios los polifenoles ácidos (69-62%). Esto se debe al proceso de vinificación; debido al reparto de las diferentes clases de polifenoles en el racimo, y de sus solubilidades respectivas, la maceración, indispensable para la extracción del color en los vinos tintos, y, más concretamente, las etapas de vinificación determinan la composición de los vinos. Así los ácidos hidroxicinámicos, que son los principales constituyentes fenólicos de la pulpa son también

compuestos mayoritarios de los vinos blancos, mientras que los vinos tintos, resultantes de una maceración encierran igualmente fuertes proporciones de flavonoides procedentes de las partes sólidas del racimo.

El vino tinto con menor concentración de polifenoles ácidos (29.1%) es el vino tinto D.O. Jumilla, aunque por el contrario es el que posee mayor concentración de flavonoides (70.9%). Esto es principalmente por el tipo de uva (tempranillo) y por los procesos específicos de vinificación propios de cada denominación de origen.

En el caso de los flavonoides cabe destacar que el proceso de fermentación dependiendo de la bodega y la D.O. puede durar de 4 a 10 días, influyendo en el menor o mayor grado de extracción de estos compuestos.

Otro factor que influye en la menor concentración de flavonoides en el vino de la D.O. Ribera de Duero es el clima, puesto que al ser un clima típicamente menos soleado que la zona de la D.O. Jumilla la uva de esta región (Ribera de Duero) tendrá menos flavonoides. En particular parece que los vinos provenientes de bayas fuertemente expuestas al sol son claramente ricos en flavonoides (Price y col. 1995).

Tabla6. Polifenoles determinados en los vinos seleccionados

	Denominaciones de Origen Vino Tinto					Denominaciones de Origen Vino Blanco	
	Ribera de Duero	La Mancha	Rioja	Jumilla	Penedés	La Mancha	Rueda
PP Totales ^a	1703 \pm 3	1495 \pm 1	1490 \pm 5	1679 \pm 21	1857 \pm 23	277 \pm 5	260 \pm 7
PP Totales(CLAE o HPLC)	777 \pm 18	609 \pm 23	690 \pm 24	711 \pm 13	587 \pm 8	175 \pm 5	154 \pm 9
Principales Grupos de Polifenoles determinados por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE o HPLC) (% PP totales CLAE)							
GRUPOS							
Ácidos Benzoicos	21.8 \pm 1.3	12.9 \pm 1.1	12.5 \pm 0.7	13.9 \pm 0.9	12.1 \pm 1.0	16.1 \pm 1.1	29.1 \pm 2.4
Ácidos Hidroxicinámicos	25.7 \pm 2.4	29.6 \pm 3.1	19.8 \pm 1.7	15.2 \pm 1.1	28.9 \pm 2.3	46.9 \pm 3.2	40.1 \pm 3.5
Ácidos fenólicos ^c	47.5 \pm 2	42.5 \pm 2.3	32.3 \pm 1.2	29.1 \pm 1.1	41.0 \pm 1.8	62.0 \pm 2.4	69.2 \pm 3.2
Flavan-3-oles	26.7 \pm 2.1	33.9 \pm 2.9	37.1 \pm 2.9	40.1 \pm 3.2	32.02 \pm 2.7	34.2 \pm 2.9	26.7 \pm 2.1
Flavonoles	16.2 \pm 1.8	17.9 \pm 1.5	20.3 \pm 1.8	21.8 \pm 1.2	20.2 \pm 1.9	3.6 \pm 0.3	4.06 \pm 0.4
Antocianinas	9.5 \pm 0.9	5.5 \pm 0.4	8.3 \pm 0.8	9.01 \pm 0.8	8.9 \pm 0.7	nd	nd
Flavonoides ^d	52.4 \pm 2	57.4 \pm 2	65.7 \pm 3	70.9 \pm 3	61.4 \pm 3	37.8 \pm 2	30.7 \pm 2

^a Polifenoles totales expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de cerveza.

^b Polifenoles determinados por HPLC agrupados en los grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^c Este grupo incluye la suma de ácidos Benzoicos y ácidos hidroxicinámicos.

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, y antocianinas.

Por otra parte en los diferentes vinos blancos analizados no hay diferencias significativas en la composición global tanto de ácidos como de flavonoides. Aunque si se ve una clara diferencia en la composición cualitativa de los ácidos fenólicos. Dicha diferencia probablemente sea causada por la presencia de diferente variedad de uva (Verdejo en el vino de D.O Rueda, que no aparece en el vino de D. O. La Mancha), así como el grado de maduración de la uva o la temperatura de fermentación (Ramos y col. 1999),.

Los polifenoles presentes en el vino descritos por la literatura (Monagasy col. 2005; Waterhouse, 2002), son mayoritariamente fenoles simples o bien oligómeros de tamaño molecular inferior al tamaño de poro de la membrana empleada en este estudio (12 Kda); esto sugiere que los compuestos fenólicos cuantificados en la disolución retenida en la membrana de diálisis, por el método Folin – Ciocalteu, están asociados a macromoléculas o tienen un tamaño molecular superior a 12 Kda. Las principales macromoléculas presentes en el vino que pueden unirse a los polifenoles son proteínas y polisacáridos; aunque diversos estudios (Ferreira y col. 2002) han detallado la presencia de proteína en el vino, en nuestro estudio, sin embargo, la mayor parte de estas proteínas son hidrolizadas debido al tratamiento con pepsina. Por otra parte los polisacáridos que no sufren hidrólisis enzimática permanecen en el interior de la membrana de diálisis constituyen la fibra dietética y por tanto susceptibles de tener polifenoles asociados

De los resultados que podemos observar en la tabla 8, se concluye en primer lugar que la FDS del vino contiene una cantidad apreciable de compuestos fenólicos asociados (35-60% en vino tinto y 9% en vino blanco). El hecho de que el porcentaje en vinos tintos sea mayor que en vinos blancos se debe a que según se describe en la literatura y se observa en la tabla 7 el vino tinto es rico en ácidos fenólicos y flavonoles, mientras que los vinos blancos son ricos en ácidos y con menor concentración de flavonoles (Monagas, Bartolomé y Gómez-Cordovés, 2005), por ello podría decirse que el vino blanco posee menos compuestos fenólicos susceptibles de asociarse a polisacáridos.

En la última década diversos estudios (Fernández-Pachón y col. 2004; Landrault y col., 2001) han mostrado la existencia de fuertes correlaciones entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del vino; igualmente, en esta memoria se observa (tabla 7) una elevada correlación entre compuestos fenólicos y capacidad antioxidante no solo en el vino, sino también al comparar los polifenoles asociados con sus respectivas capacidades antioxidantes. Obteniéndose en este segundo caso coeficientes de correlación de $R=0.94$ para la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP y $R=0.91$ en el método ABTS. Confirmando de este modo la naturaleza polifenólica.

Tabla 7 Actividad antioxidante y Compuestos fenólicos totales y asociados a la fibra dietética soluble

	Denominación de Origen (D.O.)	VINO			SOLUCION de FDS ^a		
		Polifenoles totales ^b (mg/L)	Actividad antioxidante ^c		Polifenoles totales ^{b, d} (mg/L)	Actividad antioxidante ^c	
			FRAP	ABTS*		FRAP	ABTS*
VINO TINTO	Ribera de Duero	1703 _± 3	15.25 _± 0.19	12.45 _± 0.61	568 _± 8	1.94 _± 0.13	2.27 _± 0.15
	La Mancha	1495 _± 1	12.37 _± 0.22	10.30 _± 0.52	575 _± 17	3.38 _± 0.22	2.11 _± 0.21
	Rioja	1490 _± 5	12.76 _± 0.31	9.69 _± 0.39	550 _± 12	3.01 _± 0.91	1.97 _± 0.09
	Jumilla	1679 _± 21	15.64 _± 0.37	14.21 _± 0.12	1001 _± 6	5.03 _± 0.12	2.44 _± 0.22
	Penedés	1857 _± 23	20.76 _± 0.66	15.84 _± 0.28	1107 _± 6	5.99 _± 0.08	2.89 _± 0.39
VINO BLANCO	La Mancha	227 _± 5	1.26 _± 0.03	0.53 _± 0.02	22 _± 1	0.11 _± 0.02	0.08 _± 0.001
	Rueda	260 _± 7	1.59 _± 0.08	0.77 _± 0.03	22 _± 1	0.15 _± 0.05	0.08 _± 0.002

^a Solución de Fibra dietética soluble.^b Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.^c Capacidad antioxidante expresada en mmolesTrolox /Litro de vino^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble. determinados por método Folin-Ciocalteu

Por otra parte, para demostrar que ciertamente estos compuestos fenólicos forman parte de esta fibra, y no se deben a otras circunstancias, como unión con las enzimas o debido a condiciones experimentales, se llevaron a cabo diversos ensayos adicionales, aplicando diferentes condiciones enzimáticas. Los resultados se pueden comprobar en la tabla 8.

Tabla 8. Polifenoles y proteína en disolución patrón de mezcla de fenoles, pretratamiento enzimático y post diálisis (con diferentes tratamientos)

DISOLUCIÓN DE POLIFENOLES^a	PP Totales^b (mg /L)	Proteína (mg/ L)
Pre-tratamiento enzimático	354.69±8.65	nd
Soluciones post-dialisis		
Sin tratamiento enzimático	nd	nd
Empleando enzimas desactivadas	6.51±0.91	0.15±0.01
Tratamiento enzimático	5.55±0.31	0.17±0.01

^a Solución Patrón.

^b Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro.

Como se observa en la tabla 8 se dializaron todos los polifenoles cuando no se emplearon enzimas. Por otra parte la posibilidad de que los polifenoles puedan unirse a las enzimas empleadas queda desestimada a la vista de los resultados; solo se detectaron 5.5 mg/L frente a la cantidad de partida (354.69mg/L). Este valor puede explicarse fácilmente debido a las interferencias que generan los aminoácidos, péptidos y sustancias de naturaleza proteica en el método de Folin –Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965), que en ocasiones pueden dar lugar a resultados engañosos.

Del mismo modo se eligieron dos nuevos vinos tintos: D.O. Ribera de Duero (año 2000) y D. O. La Mancha (2001), sobre los que se realizaron los mismos tratamientos que los empleados anteriormente en la disolución patrón. Los resultados se pueden ver en la tabla 9.

La contribución de las enzimas al contenido en proteína (tabla 9) en las soluciones post-dialisis es muy similar y acorde con lo determinado en la disolución patrón.

Tabla 9. Polifenoles y proteína en diferentes vinos tintos, pretamamiento enzimático y post diálisis (con diferentes tratamientos)

TRATAMIENTO	Vino Tinto		Vino Tinto D.O. La Mancha	
	D.O. Ribera de Duero			
	PP Totales ^a (mg /L)	Proteína (mg/ L)	PP Totales ^a (mg /L)	Proteína (mg/ L)
Vino^b	2239.26±25.83	0.61±0.07	1887.87±7.68	0.49±0.01
Soluciones post-dialisis				
Sin tratamiento				
enzimático	1093.66±20.37	0.49±0.02	734.77±6.87	0.350±0.005
Empleando enzimas				
desactivadas	1043.73±10.91	0.62±0.03	739.48±11.43	0.42±0.01
Tratamiento				
enzimático	757.28±8.05	0.390±0.003	728.17±17.96	0.300±0.004

^a Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino

^b Vino, pre tratamiento enzimático

De esta tabla 10 se puede deducir:

1. La concentración de polifenoles del vino dializado sin tratamientos enzimáticos (2239-1093=1146mg/L) y empleando enzimas desactivadas(2239-1043=1196 mg/L) es similar y se puede considerar como polifenoles no unidos a la fibra ni a la proteína del vino.

2. Cuando se realiza el tratamiento sin enzimas, los polifenoles que se determina dentro de la bolsa de diálisis (no dializados) van a ser compuestos fenólicos unidos a macromoléculas como proteínas y polisacáridos (digeribles y no digeribles) (1093.26 mg/L). Por otra parte cuando se realiza el tratamiento enzimático adecuado previo a la diálisis, los fenoles no dializados van a ser mayoritariamente aquellos unidos a los polisacáridos no digeribles y aquellos con tamaño molecular superior a 12 KDa. De esta manera si calculamos la diferencia entre ambos valores (1096.66-757.28=339.38 mg/L), se obtiene un valor que podría considerarse como polifenoles no asociados a fibra y/o polifenoles de elevado tamaño.

En consecuencia, si el vino tiene 2239.26mg/L de polifenoles totales, se puede realizar la siguiente operación: 2239.26-339.38=1899.88. Este valor que se obtiene se podría considerar como la suma de los polifenoles asociados a la fibra (polisacáridos no digeribles) y los polifenoles libres de tamaño molecular inferior a 12 KDa (punto de corte de la membrana de diálisis).

Finalmente si a la suma de los polifenoles asociados a la fibra (polisacáridos no digeribles) y los polifenoles libres de tamaño molecular inferior a 12 KDa (punto de corte de la membrana de diálisis)(1899.88mg/L)) se le resta los polifenoles asociados (757.28 mg/L) se obtiene un valor (1142.6mg/L), que podría considerarse como los polifenoles libres (de tamaño inferior a 12 KDa) presentes en el vino. Este dato (114.26mg/L) se acerca mucho a los polifenoles dializados cuando no se empleaban enzimas (1146mg/L) o se usaban enzimas desactivadas (1196mg/L), así como también coincide con el porcentaje obtenido por CLAE.

De este modo los polifenoles asociados a l FDS se sitúan en un rango de 34-40% o incluso superior dependiendo del vino, de la uva con la que este elaborado y del proceso de vinificación.

Al comparar los valores de polifenoles determinados en los tratamientos con enzimas desactivadas y sin enzimas , no se observan diferencias significativas, lo que parece indicar una mínima influencia o interferencia de enzimas en el método espectrofotométrico empleado para la determinación de los compuestos fenólicos.

En definitiva, de este análisis complementario deducimos que ciertos fenoles están asociados a la FDS del vino. Formando moléculas demasiado grandes para que puedan ser determinadas por HPLC (figura9), aunque si sean capaces de absorber a la longitud de onda característica de los polifenoles (figura8)

Figura 8. Espectro de absorbancia del vino tinto frente a su disolución de FDS

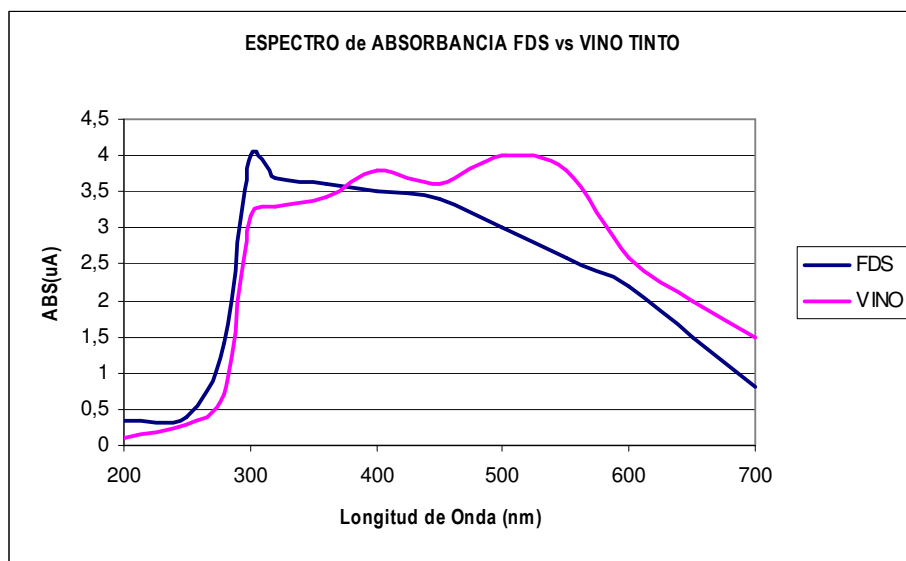
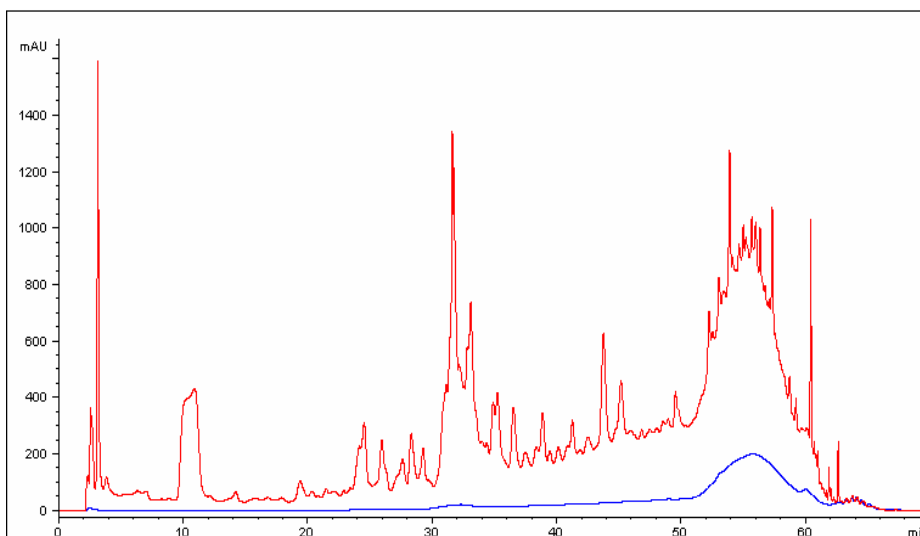


Figura 9. Cromatograma^a obtenido por CLAE de un vino tinto seleccionadas y de sus respectivas soluciones de Fibra.



^a Se muestran solo las superposiciones de los cromatogramas realizados a $\lambda=280\text{nm}$, ya que con el método empleado es la longitud de onda a la cual absorben todos los compuestos fenólicos en mayor o menor medida. ^b En color rojo se aprecia el cromatograma del vino tinto ($\lambda=280\text{nm}$), frente al cromatograma (color azul) que se obtiene a la misma longitud de onda cuando se analiza la solución de Fibra.

Una vez que se demostró la existencia de los polifenoles asociados a la FDS, el siguiente paso fue intentar averiguar exactamente que polifenoles son los que están unidos, el tipo de enlace que tienen, con que polisacárido de la fibra se unen preferentemente. Para ello se llevaron a cabo pruebas con diferentes tipos de hidrólisis, tanto químicas como enzimáticas.

La hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado a 100°C y durante 90 minutos es el procedimiento que se emplea habitualmente para el análisis de polisacáridos en la FDS; sin embargo estas condiciones destruyen la mayor parte de los polifenoles asociados a la FDS (tabla 10)

Se determinaron los compuestos fenólicos asociados en las hidrólisis ácidas y se compararon estos resultados con los PP asociados cuantificados en la disolución de FDS pre-hidrólisis ácida, observándose cómo la cantidad de polifenoles disminuye drásticamente en vinos tintos (40-80%), mientras que apenas desciende en vinos blancos.

Tabla 10. Determinación de los compuestos fenólicos asociados en las hidrólisis ácidas. Comparación con polifenoles prehidrólisis.

	Denominación de Origen (D.O.)	VINO	SOLUCION de FDS ^a	
		Polifenoles totales ^b (mg/L)	Polifenoles totales ^b (mg/L)	
			Pre-hidrolisis ^c	Post-hidrolisis con Ácido Sulfúrico
VINO TINTO	Ribera de Duero	1703 \pm 3	568 \pm 8	89 \pm 3
	La Mancha	1495 \pm 1	575 \pm 17	59 \pm 2
	Rioja	1490 \pm 5	550 \pm 12	84 \pm 4
	Jumilla	1679 \pm 21	1001 \pm 6	307 \pm 9
	Penedés	1857 \pm 23	1107 \pm 6	373 \pm 11
VINO BLANCO	La Mancha	227 \pm 5	22 \pm 1	25 \pm 1
	Rueda	260 \pm 7	22 \pm 1	24 \pm 1

^a Solución de fibra dietética soluble.

^b Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.

^c Compuestos fenólicos asociados a la fibra dietética soluble. determinados por método Folin-Ciocalteu

Estos resultados encuentran explicación en el tipo de compuestos fenólicos que poseen los vinos tintos frente a los blancos. En los vinos blancos con mayoritarios los ácidos fenólicos, que generalmente parecen glicosilados y son más resistentes a elevadas condiciones de pH y temperatura que otros compuestos fenólicos. Para apoyar esta teoría se realizó una prueba sobre patrones, aplicando el mismo tratamiento que el empleado en los vinos (ver capítulo 2)

Mientras los polifenoles ácidos (cafeico y gálico), apenas se ven afectados por las condiciones de la hidrólisis, los flavonoides principalmente la rutina (flavonol) disminuyen de manera drástica. Esto parece coincidir con los datos de la tabla 10, en los que se observaba que la hidrólisis ácida no afecta a los compuestos fenólicos de los vinos blancos. Es decir los polifenoles de tipo ácido son mayoritarios no solo en el vino blanco, y que con total seguridad estarán asociados en gran concentración a la FDS. Del mismo modo se puede explicar que flavonoles y antocianinas sean los polifenoles mayoritarios en el vino tinto frente a los polifenoles ácidos del vino blanco.

En un segundo intento por liberar los polifenoles unidos a la fibra y así saber qué compuestos fenólicos están asociados, se llevó a cabo una hidrólisis de tipo enzimático con celulasa (ver METODOLOGIA).

Como se ha comentado en anteriores capítulos, una de las características de las enzimas es su especificidad, y por tanto si quisiéramos saber realmente todos los polifenoles unidos y/o asociados (cantidad), así como cuáles son con exactitud, sería necesario conocer todos y cada uno de los enlaces PP- Polisacárido de la fibra, para de este modo emplear la enzima adecuada en cada caso., sin embargo como se deduce de la tabla 11, parece que las disoluciones de FDS existen enlaces susceptibles de ser hidrolizados por esta enzima (enlaces tipo éster)

Esta hidrólisis se realizó sobre un vino tinto (D.O. Jumilla) y un vino blanco (D.O. Rueda)

Tabla 11. Polifenoles y capacidad antioxidante tras la hidrólisis enzimática. Comparación con el vino y con la disolución de FDS antes de la hidrólisis.

		Tipo de Vino y Denominación de Origen	
		Jumilla (tinto)	Rueda (blanco)
VINO	PP Totales ^a	2312 ±21	255 ± 11
SOLUCION de FDS^c	PP Totales Asociados ^{a,d}	890±13	22.7 ± 0.1
SOLUCION de FDS^c HIDROLIZADA^e	PP Totales	983±11	150±7.6
	Asociados Hidrolizados ^{a,d}		
	Actividad FRAP ^b	6130±26	186±4.6
	Antioxidante ABTS ^b	3509±27	117±8

^a Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.

^b Capacidad antioxidante expresada en µmoles Trolox /Litro de vino

^c Solución de fibra dietética soluble.

^d Compuestos fenólicos asociados a la fibra dietética soluble. Determinados por método Folin-Ciocalteu

^e Hidrólisis enzimática con celulasa

Mediante esta hidrólisis se ha liberado una cantidad interesante de compuestos fenólicos. En la tabla 11 se observa que los polifenoles totales hidrolizados enzimáticamente son mayores que los asociados.

El valor de polifenoles asociados hidrolizados enzimáticamente (983-150 mg/L) es mayor que los compuestos fenólicos cuantificados en el complejo de FDS antes de la hidrólisis, pero inferior a los fenoles determinados en la muestra original (en este caso la botella de vino). Este hecho podría parecer equívoco, sin embargo en todas las determinaciones mencionadas se empleó el método Folin

Ciocalteu, un método que a pesar de ser rápido y sencillo no deja de adolecer de diversos fallos e interferencias (Folin y Denis, 1912; Singleton y Rossi, 1965). Este método frecuentemente genera dificultades durante su aplicación debido a formación de molestos precipitados, desviación de la Ley de Lambert Beer (principalmente cuando la concentración de polifenoles es muy alta) y grandes variaciones entre análisis (dentro de la misma muestra) si las condiciones del ensayo no se duplican exactamente. También el tipo de matriz influye.

En cualquier caso la reacción en que se basa el método es una reacción de oxidación-reducción en medio básico, en la que el reactivo (amarillo) de origen metálico oxida los fenolatos, generando una mezcla de pigmentos azules cuya composición no se conoce realmente, puesto que tanto el reactivo como el posterior pigmento azul no son estables en medio demasiado alcalino.

Igualmente la hidrólisis con celulasa realmente rompe enlaces tipo éster, por lo que aquellos compuestos fenólicos con sustituciones mediante este tipo de enlace (como el ácido ferúlico) pueden sufrir no solo la ruptura del enlace que les une a los polisacáridos de la fibra sino la ruptura adicional de estos grupos que se encuentran unidos mediante sustituciones nucleofílicas, (formando por ejemplo ésteres de metilo), generándose más grupos del tipo fenolato susceptibles de participar en la reacción redox del método Folin-Ciocalteu, existiendo sin embargo el mismo número de compuestos fenólicos.

Del mismo modo se aprecia una clara correlación entre los polifenoles liberados por la celulasa y la capacidad antioxidante, principalmente al aplicar el método FRAP (coeficiente de correlación en vino tinto $R=0.9993$)

Tabla 12. Polifenoles determinados por CCLAE tras la hidrólisis enzimática.

		Tipo de Vino y Denominación de Origen	
		Jumilla (tinto)	Rueda (blanco)
Método Folin-Ciocalteu	PP totales asociados hidrolizados ^b	983±11	150±7.6
Método HPLC^c	Ácidos Benzoicos	31.7±1.7	14.04±0.7
	Ác. Hidroxicinámicos	14.8±1.1	25.35±2.1
	Flavonoides ^d	46.4±2.7	60.6±4.1
	Antocianidinas	7.05 ± 0.5	nd

^a Hidrólisis enzimática con celulasa

^b Polifenoles totales expresados como mg. equivalentes de Ác. gálico/Litro de vino.

^c Polifenoles determinados por CLAE agrupados en los 3 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por CLAE.

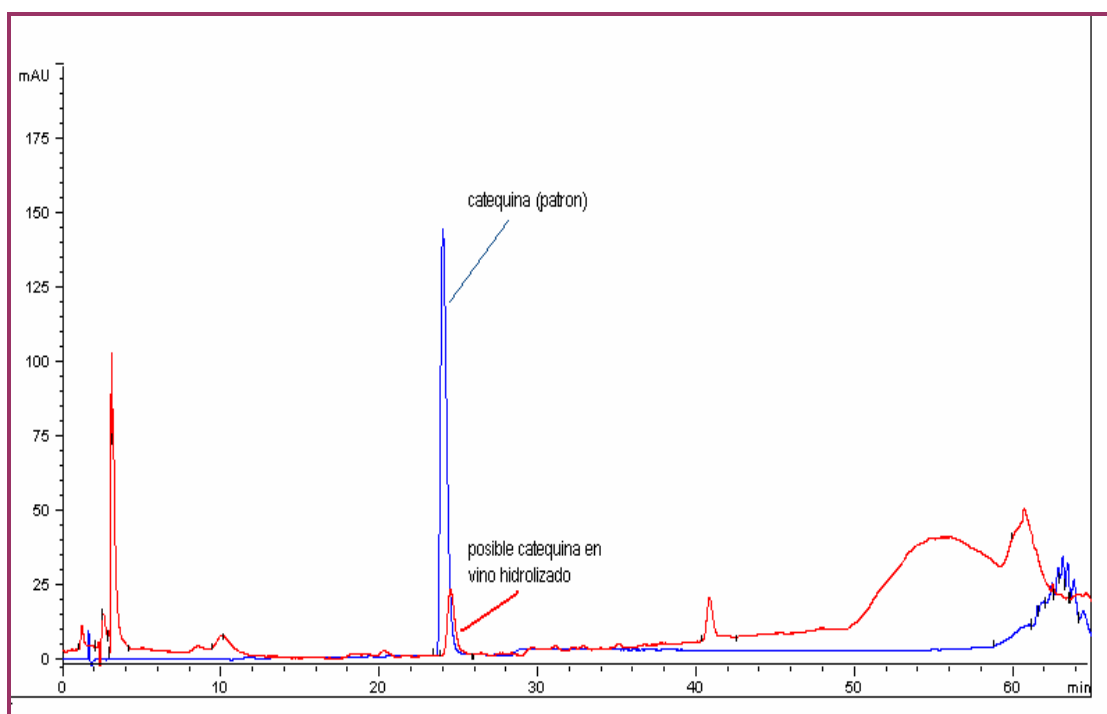
^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas,

Los Flavan-3.oles (catequinas) tienen un mejor factor de respuesta en el método folin-Ciocalteu (con una recta de calibrado de pendiente= 0.002), similar a los ácidos, mientras que los flavonoles, como la Rutina reaccionan peor con el reactivo colorimétrico (pendiente de la recta = 0.00044). De esto solo podemos deducir que la celulasa parece que libera mayoritariamente flavan-3-oles y polifenoles de tipo ácido. Estos datos por otra parte están en concordancia con los resultados que se obtuvieron cromatográficamente (tabla 12)

En ambos vinos se liberan fundamentalmente flavonoides, concretamente flavan-3-oles en vino tinto. De todos los compuestos fenólicos, son los polifenoles ácidos seguidos de los flavan-3-oles los grupos con mayor tendencia a aparecer unidos a polisacáridos. Concretamente Vidal y col, (2004) describen la capacidad del RGII de ayudar no solo a la agregación de las proantocianidinas, si no de coagregarse con ellas. y recordemos que el RG II forma parte de la fibra dietética soluble.

Del mismo modo se presenta en la figura 10, la comparación de los cromatogramas entre la disolución de FDS hidrolizada con celulasa y una disolución patrón de catequina. Mediante esta figura se confirma de nuevo la existencia no solo de polifenoles asociados a la fibra, si no la mas que probable existencia de catequina como uno de ellos.

Figura 10. Comparación de los cromatogramas (CLAE) de un patrón de catequina y la hidrólisis enzimática de la FDS



Por otra parte la existencia de los ácidos asociados a la fibra se sustenta en la correlación existe entre el arabinogalactano (expresado como arabinosa+ galactosa) determinado en la FDS y los ácidos Benzoicos aparentemente liberados por la hidrólisis enzimática. Ciertamente desde el punto de vista estadístico elaborar una correlación con solo dos puntos, no es suficiente, sin embargo el elevado coeficiente de correlación $R=1$, podría indicar cierta tendencia que por otra parte esta de acuerdo con datos bibliográficos (Ralet y col. 1994; Kroon y Williamson, 1996; Kroon y col. 1999).

Proteína Resistente. Finalmente, para averiguar si realmente existe un complejo FDS(polisacáridos no digeribles)-PP-Proteína, se llevó a cabo la determinación de proteína indigerible (tabla 13). Aproximadamente entre 51-76% es proteína no digerible, es decir, no sufrieron degradación por las enzimas empleadas en el método de análisis (que por otra parte simula el proceso de digestión), y que según la última definición aceptada (De Vries 2004) van a formar parte de la fibra dietética

Tabla 13. Proteína y digestibilidad de proteína en diversos vinos

Tipo de Vino y D.O.	Proteína en		Proteína Digestible (g/l)	Digestibilidad Proteína (%)	Proteína no digerible (%)
	Vino	Fibra ^a			
Jumilla Tinto	0.60±0.05	0.301±0.003	0.29±0.05	49	51
Ribera de Duero (tinto)	0.61±0.07	0.39±0.003	0.22±0.07	36	64
La Mancha (tinto)	0.49±0.01	0.30±0.004	0.19±0.01	39	61
Rueda (blanco)	0.033±0.002	0.025±0.002	0.008±0.002	24	76

^a Solución de Fibra dietética soluble

Aparentemente el vino blanco posee mayor cantidad de proteína no digerible (76%). El vino blanco tiene mayor concentración de manosa en la FDS que los vinos tintos descritos en la tabla 15. Esto indicaría que buena parte de la proteína no digerible está unida a esta manosa, formando manoproteínas, procedentes de las levaduras y liberadas por autólisis durante la fermentación.

Las Manoproteínas poseen cerca de 10% de proteína, frente al 4% de proteína que usualmente encontramos en los AGP, los cuales son mayoritarios en vinos tintos frente a manoproteínas (Pellerin y col. 1995).

Las proteínas así como ciertos azúcares y/o polisacáridos son las principales moléculas capaces de unirse a polifenoles (Pellerin y col 1995, Vidal y col 2004). En el caso de los polisacáridos hemos visto que tienen afinidad por polifenoles ácidos, y procianidinas (Vidal y col 2004) mientras que en el caso de la proteína datos bibliográficos (Poncet-Legrand y col. 2006) apuntan a afinidad casi exclusivamente por ciertos flavonoides.

En nuestros análisis se ha visto correlación entre Arabinogalactanos (arabinosa + galactosa, cuantificados por cromatografía de gases) y proteína no digerible ($R=0.93$), con especial énfasis en vinos tintos, mientras que entre los compuestos fenólicos asociados a la fibra y la proteína no digerible no existe correlación alguna lo que nos lleva a pensar de nuevo a que los polifenoles se encuentran en su mayoría asociados a los polisacáridos de la fibra.

En definitiva parece que podemos hablar de la existencia de un complejo de Fibra Dietética (Fibra dietética soluble- polifenoles- proteína) en vino (Ver Anexo I con fotos realizadas mediante microscopia electrónica de barrido y Anexo II con fotos del complejo liofilizado), cuyas concentraciones son desde 2.6 g/l en el vino tinto hasta 0.17 g/L para el vino blanco.

Este complejo posee entre 33-60% de los polifenoles totales del vino tinto y entre 51-64% de la proteína, mientras que en el vino blanco los polifenoles asociados son 9% de los PP totales y la proteína 76% (figura 11 a y 11 b). Es decir que del total de compuestos fenólicos que posee el vino (fundamentalmente el vino tinto) no todos van a ser absorbidos durante el tránsito intestinal. Entre el 9 y el 60% (dependiendo del vino) llegarán intactos al colon, y el resto (91-40%) cabe suponer que sean debidamente absorbidos y metabolizados.

Sin embargo aún es necesaria una mayor investigación para conocer con total exactitud qué polifenoles son absorbidos y cuales permanecen asociados a la fibra

Figura 11 a. Contribución de los polifenoles la proteína y los polisacáridos no digeribles al complejo de FDS en vino tinto

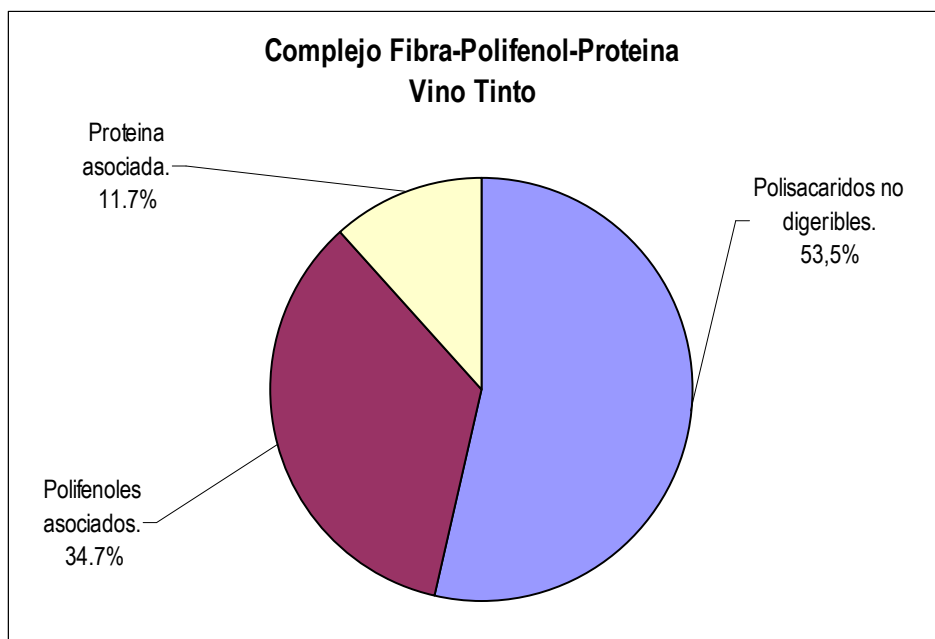
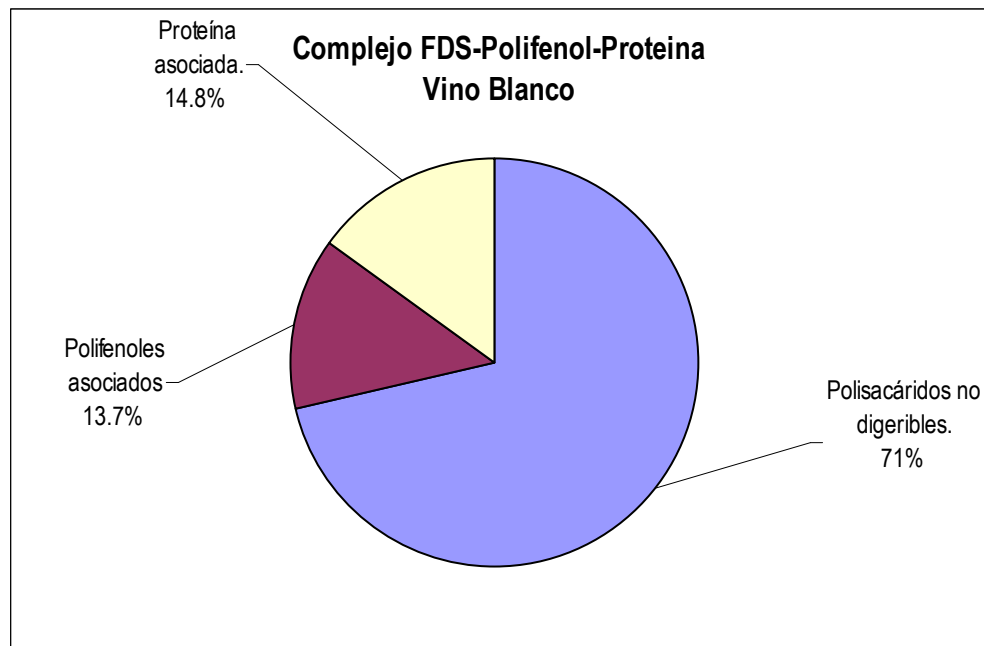


Figura 11 b. Contribución de los polifenoles la proteína y los polisacáridos no digeribles al complejo de FDS en vino blanco



En las figuras 10 a y b se observa claramente la proporción en que se encuentran cada uno de los componentes del complejo, polisacáridos no digeribles (Fibra soluble propiamente dicha), proteína y polifenoles. En todos los casos los polisacáridos no digeribles se presentan en mayor porcentaje, siendo el mayor en el vino blanco; debido a que aunque la cantidad total del complejo es menor también posee menor cantidad tanto de PP asociados como de proteína no digerible.

En cualquier caso, este complejo llegara intacto al colon, donde los polisacáridos sean fermentados por la microflora colónica, favoreciendo la liberación y posible fermentación de los polifenoles asociados (esta fermentación dependera de la naturaleza del polifenol). De este modo estos polifenoles y sus posibles productos de degradación pueden contribuir a crear un status antioxidante en el colon que contribuye a la prevención de diversas enfermedades.

En resumen

En las tablas internacionales de composición de alimentos no aparece información sobre la presencia de fibra dietética en vino. Sin embargo como hemos visto es el tercero cuantitativamente más importante en el vino tinto.

El vino tinto presenta un contenido en fibra dietética soluble del(0.94-1.37 g/L), mientras que el vino blanco se encuentra en torno a 0.2-0.4 g/L .

Arabinogalactanos, seguidos por Ramnoglacturonano II y en menor concentración, los mananos de las levaduras son los principales constituyentes de la fibra dietética soluble en el vino.

La fibra dietética en el vino aparece como un complejo formado por polisacáridos no digeribles, polifenoles asociados y proteína no digerible.

El vino tiene una cantidad apreciable de compuestos fenólicos asociados formando parte del complejo de fibra, siendo entre 35-60% en vino tinto y un 9% en vino blanco.

La hidrólisis enzimática con celulasa parece efectiva , liberando principalmente flavonoides.

Mas de 50 % de la proteína (51%-64% en vino tinto y 76 % en vino blanco), es no digerible, formando parte del complejo de fibra.

La importancia biológica y nutricional de la fibra dietética del vino y concretamente su influencia en la biodisponibilidad de los compuestos asociados (polifenoles) emerge como próximo tema de investigación.

CERVEZA

I. ANTECEDENTES.

1. CERVEZA. DEFINICIÓN, COMPOSICIÓN Y ELABORACIÓN.

Según la reglamentación Técnico-Sanitaria Española, "la cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimático, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La malta puede ser sustituida por malta de cereales, granos crudos que contengan féculas, así como azúcares, siempre que las sustancias añadidas no excedan del 50% en masa de la materia prima utilizada.

En la cerveza, la calidad de cada uno de sus ingredientes (agua, cebada, lúpulo, levadura) es indispensable para la obtención de un buen producto final. En la elaboración de la cerveza podemos destacar 4 etapas fundamentales (figura 1): malteado, cocción y adición de lúpulo, inoculación de levadura y fermentación, maduración y clarificación (Belitz y col . 2004).

El Malteado consiste en hacer germinar los granos de cebada (la cebada es el único cereal que debe de maltearse necesariamente), para activar las enzimas presentes en el propio grano. Una vez que se alcanza el grado óptimo de germinación se procede al secado y tostado del cereal (cebada) germinado. A bajas temperaturas, el tostado es mínimo y se habla de maltas claras (llamadas también maltas Lager o Pale según el país en que se producen). A medida que se aumenta la temperatura del horno, la malta resultante es cada vez más oscura produciendo malta negra. El grado de tostado de la malta determina el color de la cerveza.

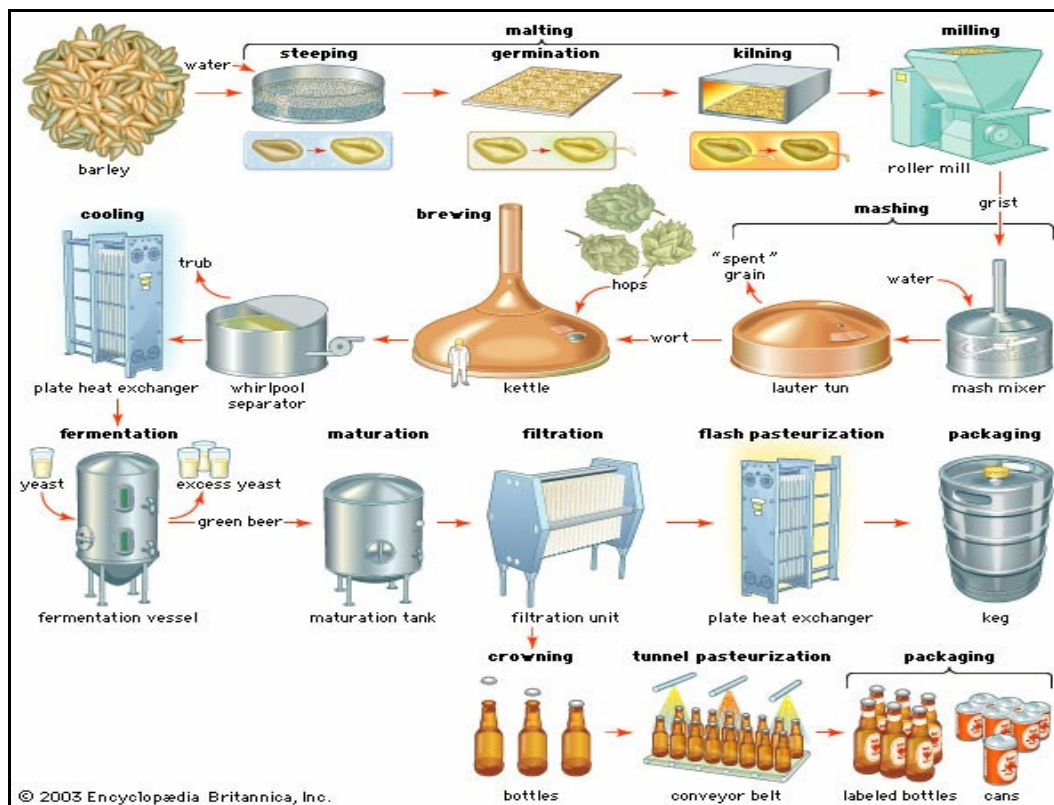
Durante la *Cocción y adición de Lúpulo* la malta molida se mezcla con agua y se somete a diversas etapas mas o menos largas, a temperaturas sucesivas de 45 °C (proteolisis) , 62°C (amilolisis hasta maltosa) y 72°C (hasta dextrinas) aproximadamente. Estas temperaturas provocan que los almidones contenidos en la malta se transformen en azúcares simples y fermentables. Este mosto resultante se filtra y se hierve (para destruir la actividad enzimática). Al final del proceso de ebullición se procede al lupulado (adición del lúpulo que aportará a la cerveza su sabor amargo y los aromas propios).

Después se prepara la *fermentación, añadiendo levadura* al mosto. Es imprescindible enfriar el mosto a la temperatura de fermentación antes de entrar en contacto con la levadura para que la fermentación sea rápida y eficaz. Se fermenta el mosto con una sola cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (fermentación alta) o de la cepa *Saccharomyces uvarum* (también denominada *S. carlsbergensis*) (baja fermentación). Para elaborar la cerveza sin alcohol, una de las técnicas que pueden emplear los fabricantes se basa en procesos específicos que reducen la formación de alcohol en la fermentación,

utilizando levaduras especiales o disminuyendo el contenido en mosto original. En España se emplea habitualmente levaduras de fermentación baja (Lager).

Finalmente, la etapa de *maduración* comprende el tiempo que va a permanecer la cerveza en los tanques a baja temperatura antes de ser filtrada; suele ser un mínimo de tres semanas ($T=-1^{\circ}\text{C}-0^{\circ}\text{C}$). Al finalizar la maduración, se realiza la filtración, retirando las levaduras. Una vez clarificada, la cerveza se gasifica, y se embotella o se envasa en barril.

Figura 1. Proceso general de elaboración de la cerveza



Fuente: Enciclopedia Británica. 2003

Tanto el proceso de elaboración como la elección de una adecuada materia prima inciden de manera crítica en **la composición de la cerveza** (Tabla 1).

Las diversas cervezas difieren entre sí por las diferentes proporciones en que están presentes sus propios constituyentes, que a su vez dependen del proceso de elaboración de la cerveza. Podemos clasificar los componentes de la cerveza en volátiles y no volátiles; Los primeros son los que se forman principalmente en la fermentación, dentro de los cuales podemos incluir a los alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, etc.

Los componentes no volátiles forman un conjunto más heterogéneo, incluyendo:

- Compuestos inorgánicos. La mayoría proceden exclusivamente de la materia prima de partida, especialmente de la cebada malteada y de los adjuntos.
- Compuestos orgánicos. Los más destacados son:

Los hidratos de carbono, cuyo contenido por 100 ml fluctúa entre 2.5 y 4 gramos por 100 ml según el tipo de cerveza, apareciendo en forma de azúcares sencillos como ribosa, xilosa, arabinosa, glucosa, fructosa o galactosa, disacáridos del tipo maltosa, isomaltosa, principalmente, y otros polisacáridos como dextrinas, pentosanos o beta-glucanos que proceden de la pared celular del endospermo del grano de cebada.

Componentes nitrogenados, Los compuestos nitrogenados representan entre 0,15-0,7%, y proceden fundamentalmente de las proteínas del material de partida y de las levaduras (Hough y col 1982). Gran parte de las proteínas se degradan durante el malteado, originando aminoácidos y péptidos solubles. Las proteínas de alto peso molecular son las responsables del enturbiamiento en frío, mientras que los aminoácidos presentes en el mosto sirven de nutrientes a las levaduras. El contenido medio para cada tipo de cerveza es de 0.4 g para las denominadas oscuras, 0.5 g para las rubias y 0.25 g para las claras. (Cortacero-Ramírez y col. 2003, Hough y col 1982).

La proteína de la cerveza proviene del grano de cebada, aunque puede haber una mínima cantidad proveniente de las levaduras. La cantidad total de la proteína es crucial para la calidad final de la cerveza, puesto que intervienen en la textura, cuerpo, color y valor nutricional. De entre todos los compuestos de la cebada, quizá la proteína sea el más importante para evaluar la calidad de la malta y la cerveza. El contenido de proteína de la cebada es de 8-15% s.s., siendo las hordeínas las más abundantes (40-50% de las proteínas, según Osman y col , 2002). Además de la hordeínas se han identificado otras proteínas, como albúmina, glutelinas (globulinas), friabilina, enzimas y otras con funciones no claramente definidas (Finnie, y col., 2002; Fox y col., 2002; Osman, y col., 2003; Østergaard, y col. 2004). Los escasos estudios sobre albúminas en cerveza (Hejgaard, 1982; Lindford-Larsen y Winter, 2001; Curioni y col.1995), se centran en la denominada proteína Z (glicoproteína hidrofóbica) y en la LPT 1 (glicoproteína de 9.7 KDa).

Tabla 1. Composición típica de una cerveza pilsner .

Compuesto	Concentración (g/L cerveza)
Etanol	40-60
Carbohidratos totales	0-61
Proteína	3-5
Lípidos	No detectados
Tiamina	$(0.003-0.08) \times 10^{-3}$
Riboflavina	$(0.02-0.8) \times 10^{-3}$
Vitamina B6	$(0.07-1.7) \times 10^{-3}$
Ac. Pantoténico	$(1.0-1.7) \times 10^{-3}$
Niacina	0.003-0.008
Biotina	$(0.002-0.015) \times 10^{-3}$
Vitamina B12	$(0.003-0.030) \times 10^{-3}$
Folato	$(0.04-0.6) \times 10^{-3}$
Acido ascórbico	Superior a 0.03
Otros ácidos orgánicos (succinico, cítrico, láctico...)	0.6-0.8
Calcio	0.04-0.14
Potasio	0.3-1.1
Sodio	0.04-0.23
Fósforo	0.09-0.4
Magnesio	0.06-0.2
Sulfato	0.15-0.25
Polifenoles	0.1-0.4
Iso- α -ácidos	0.02-0.04
Dióxido de Carbono	4-6
Otros compuestos (ésteres, glicerol...)	1-1.9

Fuente: Bamforth 2002

Compuestos fenólicos (tabla 2) aparecen en cantidades de 15 a 35 mg/100 ml; una parte son volátiles (contribuyendo al aroma de la cerveza) pero la mayoría son polifenoles no volátiles (influyendo en color , sabor y estabilidad coloidal). Dos tercios proceden de la malta y el resto del lúpulo. Estos compuestos fenólicos pueden polimerizar con las proteínas ocasionando enturbiamientos en cerveza ("turbios") Estos polifenoles además de aportar propiedades antioxidantes (Maillard y col. 1995; Lugasi, 2003) y otros beneficios para la salud (Bamforth, 2002), son responsables de ciertas características organolepticas de la cerveza, como el aroma (Mikyska y col. 2002), astringencia (Goupy y col 1999) así como de otras de carácter mas tecnologico (turbidez, color y estabilidad) (Goupy y col 1999).

El lúpulo es una planta rica en compuestos fenólicos, la concentración de polifenoles en el lúpulo (4-14%)(Gerhauser, 2005), depende de la variedad, origen, manera en que se cosecha, almacenamiento y se dividen básicamente en ácidos fenólicos, proantocianidinas oligoméricas (dímeros, trímeros e incluso tetrámeros de flavan-3-oles), y prenilflavonoides. Todos estos compuestos poseen

diversas propiedades beneficiosas para el organismo (actividad antioxidante, anticarcinogénica, actividad estrogénica). Concretamente el grupo de los prenylflavonoides es especialmente importante puesto que el lúpulo es prácticamente la única fuente natural de este tipo de compuestos, como el xantohumol, isoxantohumol (Alekseeva y col 2004) y 8-prenylnaringenina (8-PN). Estos compuestos han comenzado a estudiarse a fondo hace relativamente poco tiempo y sin embargo poseen unas propiedades estrogénicas mayores que las isoflavonas genisteina y daidzeina (Stevens y Page 2004). El xantohumol tiene mayor poder antioxidante protegiendo las LDL y VLDL de la oxidación, que la vitamina E (Vinson y col, 2003).

Las proantocianidinas se encuentran en el lúpulo en unas concentraciones entre 0.5-5% s.s., incluyendo catequina, epicatequina, y procianidinas B1-B4; también se han descrito triméritos, que poseen una gran actividad antioxidante, pero aun no se ha elucidado claramente su estructura (Hui-Jing Li y Deinzer, 2006). Estas procianidinas B1-B4 del lúpulo son potentes inhibidores de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) así como de 3-oxo-6-phenylisatin-5-one (SIN-1) (inductor de la oxidación de LDL) (Stevens y col, 2002).

Los compuestos fenólicos de la cebada incluyen ácidos fenólicos, sus ésteres y glicósidos, antocianidinas, proantocianidinas, lignanos y derivados de lignina.

Los ácidos fenólicos (hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos), tanto sus formas libres como los glicósidos se encuentran en las capas más externas del grano (cáscara, pericarpio, aleurona), y en menor concentración en el endospermo (Naczki y Shahidi, 2006). El ácido ferúlico es el ácido fenólico mayoritario seguido por el ácido p-cumárico y el ácido vainillínico.

La capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos se caracteriza por su capacidad de captar radicales libres mientras que en el caso de los flavan-3-oles, su actividad antioxidante se centra principalmente en actuar sobre radicales de tipo lipídico para hacerlos más estables. Están relacionados con la capacidad de inhibir la oxidación de LDL y VLDL.

Tabla 2. Principales compuestos fenólicos de la cerveza descritos en bibliografía.

Fenoles simples
4-Vinyl fenol, 4-Vinyl guayacol, 4-Etilfenol, Isoeugenol, Tirosol
Ácidos Hidroxibenzoicos y derivados
4-Ácido Hidroxibenzoico, Ác. Protocatequico, Ác. Vainillinico, Ác. Gálico, Ác. Siringico, Aldehído Salicílico, o-Vanillinico, Aldehído Siringico
Ácidos hidroxicinámicos y derivados
Ác. Cinámico, Ác. <i>p</i> -Coumarico, Ác. Cafeico, Ác. Ferulico, Ác. Sinápico
Cumarinas
Umbelliferon, Scopoletina, Daphnetina.
Flavan-3-oles (Catequinas)
(+)-Catequina, (-)-Epicatequina, Galocatequina, Catequin galato, Epicatequin galato, 3'-O-metilcatequina, Catequin-7-O- β -D-glucopiranosido, Catequin-7-O- β -(6"-O-nicotinoil)- β -D- glucopiranosido
Proantocianidinas
Procianidinas B 1, B2, B3, B4, Procianidina C2, Prodelfinidina B3 y B9, Prodelfinidina C ent-Epigalo-catequin-(4 α →8, 2 α →O→7)catequina, ent-Epigalo-catequin(4 α →6, 2 α →O→7)catequina
Chalconas
Xantohumol, Desmetilxantohumol
Flavanonas
Isoxantohumol, Naringenina, 8-Prenylnaringenina y 6-Prenylnaringenina, Taxifolin
Flavonas
Apigenina, Chrysoeriol, Tricina, Apigenin-6-C-glucosido (saponaretina), Apigenin-6-C-glucosido-7-O-glucosido (saponarina), Vitexin
Flavonoles
Kaempferol, Kaempferol-3-ramnosido, Quercetina, Quercitrina, Isoquercitrina, Rutina, Miricetina, y Miricitrina

Alcohol etílico, que se produce en la fermentación, junto con el dióxido de carbono a razón de un gramo de alcohol por cada 1,6 gramos de sustrato hidrocarbonado. Su concentración depende del extracto original del mosto. La mayoría de las tablas de composición de alimentos dan valores próximos al 5%.

Las *vitaminas* que encontramos en la cerveza proceden de la malta, incrementándose en la germinación de la cebada y sobreviviendo al tostado. La cerveza contiene pequeñas cantidades de vitaminas del grupo B (tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, cianocobalamina, niacina), también posee ácido fólico y folatos.

Otros compuestos. La cerveza contiene una pequeña proporción de lípidos (Bravi y col. 2007) procedentes de la malta, adjuntos y lúpulo; también pueden ser resultado del metabolismo de las

levaduras durante la fermentación. Son principalmente ácidos grasos, mono-, di-, y triglicéridos, junto con trazas de esteroides y fosfolípidos. Su presencia afecta negativamente a la estabilidad de la espuma pero positivamente al aroma de la cerveza.

También podemos encontrar en la cerveza las denominadas melanoidinas, compuestos formados en los alimentos durante su tratamiento térmico. Se originan mediante las reacciones de Maillard entre los grupos amino de los péptidos y proteínas y los grupos aldehído del azúcar (Vernin y Parkanyi, 1982). Estos compuestos aromáticos suelen proceder de la malta, originados durante el tostado.

Entre los compuestos inorgánicos cabe destacar la presencia de sales minerales (0,3-0,4%) siendo los principales el potasio y los fosfatos, así como cierta concentración de hierro, plomo, cobre, cinc y estaño que producen turbidez en la cerveza.

2. HIDRATOS DE CARBONO Y FIBRA DIETÉTICA EN CERVEZA

Entre 3.3-4.4% (peso/vol) de la cerveza son Hidratos de carbono, de los cuales los mayoritarios son las dextrinas o maltodextrinas, seguidos por los monosacáridos y oligosacáridos, β -glucanos, y pentosanos (Tabla 3).

El 75-90% de los carbohidratos son dextrinas con grado de polimerización normalmente superior a 4. Las dextrinas son un grupo de carbohidratos solubles en agua, de bajo peso molecular (polímeros de sacáridos formados por unidades de D-glucosa con enlaces α - (1-4)), producidas por la hidrólisis del almidón. Por acción de enzimas, de la amilosa se liberan dextrinas lineales mientras que la amilopectina libera dextrinas con cadenas laterales. Estos polímeros tienen la misma fórmula general que los carbohidratos pero son de una longitud de cadena más corta. El almidón de la cebada está formado por ambos, amilosa y amilopectina. Las maltodextrinas por otra parte están constituidas por unidades de glucosa enlazadas entre sí por enlaces α - (1-4) y α - (1-6), con grado de polimerización habitualmente comprendido entre 4 y 10 (Bertoft y col. 2000; Bertoft y Manelius, 1992; Schur y Piendl, 1977; Shanta-Kumara y col. 1995); dextrinas y maltodextrinas permanecen en el mosto y cerveza por la falta de actividad enzimática desramificante en la batería de enzimas que se producen en el proceso de germinación del grano. Su concentración habitual es del 2.6-3.5% del peso de la cerveza. Entre sus propiedades más importantes, se incluyen higroscopicidad, fermentabilidad, viscosidad y gelificación. Influyen en el sabor de la cerveza (dan "cuerpo"), participan en la formación de la espuma y tiene valor nutritivo (4 kcal/g). No todas las formas de dextrina son digeribles, y la dextrina indigerible se utiliza a veces en suplementos de la fibra.

Tabla 3. Carbohidratos de la cerveza

Carbohidratos digeribles	Carbohidratos no digeribles
Dextrinas	β -glucanos y arabinoxilanos
Maltotriosa	Ciertas dextrinas
Sucrosa, Maltosa	Celobiosa
Fructosa, Glucosa	Laminaribiosa
Carbohidratos en menor concentración: Arabinosa , Galactosa ,Ribosa , Xilosa , Isomaltosa, Panosa, Isopanosa, Kojibiosa, Nigerosa, Maltulosa, Maltotetraosa.	

Entre los azúcares que cuentan con menos de cuatro unidades de glucosa, que son capaces de permanecer en la cerveza después de la fermentación, se hallan glucosa, fructosa, maltosa, sucrosa y maltotriosa. Glucosa y fructosa son los principales monosacáridos, mientras que los disacáridos mayoritarios son maltosa, que aparece durante el malteado y cocción, y sucrosa (proviene del propio grano de cebada) (Cortacero-Martínez y col. 2003), aunque también podemos encontrar kojibiosa (2-O- α -D glucopiranosil-D- glucosa), nigerosa (3- O- α -D glucopiranosil-D- glucopiranosil-D- glucopiranosil-D- α -D -fructofuranosa).

Entre los trisacáridos destacan la panosa (trisacárido reductor formado por una unidad de maltosa unida a glucosa mediante un enlace glucosídico (α -1,6)), isopanosa y maltotriosa.

Arabinoxilanos y β -glucanos (ambos procedentes del endospermo del grano de cebada) son los principales polisacáridos no amiláceos (polisacáridos distintos del almidón) que encontramos en las paredes celulares del grano de cebada (Holtejolen y col.. 2006), y por ende en la cerveza. Son parcialmente degradados por enzimas endógenas durante el proceso de germinación, pero permanecen en apreciables concentraciones en el producto final.

Los azúcares fermentables contribuyen de forma directa al sabor, mientras que los carbohidratos de mayor tamaño (mas de 4 unidades) aportan cuerpo a la cerveza. Los β -glucanos y arabinoxilanos influyen en la viscosidad (Jian Lu y Yin Li 2006; Yin Li y col. 2005, Jin, Y.-L y col .2004), filtración y formación de los denominados “turbios”; estos polisacáridos no amiláceos forman disoluciones viscosas que, afectan no solo a la filtración y clarificación durante la última fase de elaboración de la cerveza sino que también contribuyen a los problemas de extracción en la industria cervecera (Han y Schwarz 1996; Voragen y col. 1987; Vietor y Voragen 1993).

Sin embargo, los polisacáridos, fundamentalmente β -glucanos tienen otros efectos no tecnológicos, y beneficiosos en la salud. Los β -glucanos aumentan la viscosidad del bolo alimenticio en el intestino grueso, ayudan en la disminución de los niveles de colesterol en sangre (reduciendo de esta manera el riesgo de accidentes cardiovasculares) así como controlando el nivel de glucosa en sangre (Holtekjolen y col 2006).

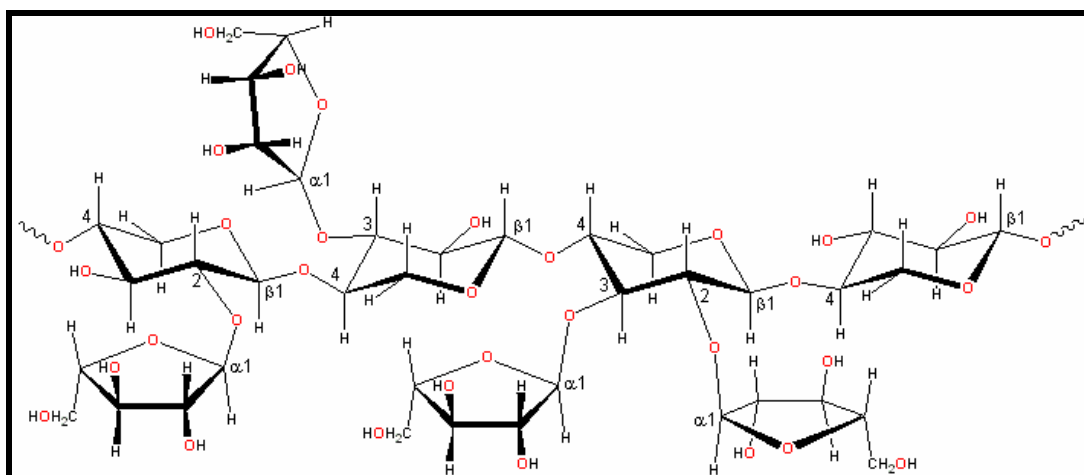
Arabinosilanos y especialmente β -glucanos son capaces de formar soluciones viscosas en agua, que por un lado contribuyen no solo a problemas de filtración en la industria cervecera sino que también influye negativamente en alimentación animal, la elevada viscosidad hace más lenta la digestión además de reducir el valor nutritivo y por tanto la eficiencia en la alimentación. Sin embargo su capacidad de retención de agua influye positivamente en la calidad de los alimentos y de hecho se emplean bastante como aditivos en industria alimentaria (Ulltveit, 2000).

3. COMPLEJO DE FIBRA DIÉTETICA: POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES Y COMPUESTOS ASOCIADOS

La importancia de los carbohidratos de la cerveza se ve reflejada en la gran cantidad de estudios publicados hasta la fecha, pero del mismo modo, también podemos deducir que la mayoría de estas investigaciones se centran en las propiedades sensoriales (aroma) y tecnológicas (espuma) que estos polisacáridos y carbohidratos son capaces de aportar; mientras que es de destacar la escasez de trabajos acerca de estos compuestos desde punto de vista nutricional. La mayor parte de los carbohidratos de la cerveza (Tabla 3), son digeribles y participan en el valor calórico de la cerveza. Sin embargo, una cantidad variable (según tipo de cerveza: rubia, negra) y significativa llega al intestino y finalmente al colon, donde puede ser sustrato de fermentación de la microflora colonica. Estos carbohidratos no digeribles (fundamentalmente β -glucanos y arabinosilanos) son los constituyentes principales de la fibra soluble de la cerveza, aunque también se pueden encontrar trazas de celobiosa, laminarabiosa y algunas dextrinas derivadas del almidón.

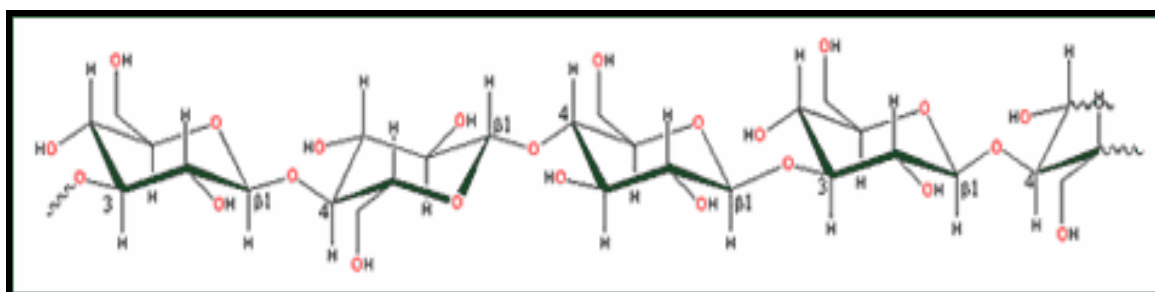
Los arabinosilanos (pentosanos) están formados por un complejo esqueleto de D-xilas y arabinosas, unidas entre sí por enlaces glicosídicos β -(1-4) (figura 2); algunas de estas Xilas están sustituidas en las posiciones O-2, O-3 ó en ambas por residuos de α -1 arabinosa. Son polímeros de elevado peso molecular parcialmente solubles en agua, que constituyen entre 4-8% del grano de la cebada y son los principales constituyentes de las paredes celulares de la aleurona y del endospermo (Han y Schwarz 1996).

Figura 2. Arabinoxilano



Los β -glucanos son cadenas lineales de glucosa (homopolisacáridos), unidas entre si por enlaces β -1,3 ó β -1,4 (figura3). Aproximadamente el 70% de los enlaces son β -1,4, mientras que tan solo el 30% restante son del tipo 1-3; de hecho, los enlaces β -1,3 Tienen un peso molecular variable, entre 30000-300000 (Sendra y col. 1989) y su concentración varía igualmente entre 50-700mg/L.

Figura 3. β -glucanos



Aunque los β -glucanos solo suponen un 2% (aproximadamente) de las dextrinas de las cervezas, su participación en las propiedades del mosto y de la cerveza como producto final es importante debido a que aumenta sensiblemente la viscosidad dificultando las operaciones de filtración pudiendo producir precipitados gelatinosos en las cervezas envasadas.

El concepto de carbohidratos no digeribles de la cerveza como Fibra soluble es relativamente nuevo, hasta la fecha pocos estudios se han publicado centrados en este concepto (Bamforth y Gambill, 2007). Por ello es necesario obtener mas información, no solo de la composición de esta fibra, si no también de sus propiedades fisiológicas y nutricionales, Así como de la posible existencia de un complejo

fibra dietética formado por POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES (fibra propiamente dicha) -POLIFENOL-PROTEINA.

Durante el malteado se activan enzimas que contribuyen no solo a la hidrólisis del almidón y otros hidratos de carbono, si no que también se activan otras enzimas que pueden contribuir a la hidrólisis de las hordeinas (proteínas insolubles en agua) (Silva y col. 2007), y modificar **otras proteínas** (Jones y Marinac, 2002).

Diversos estudios (Siebert, 2006) han descrito la elevada afinidad por unirse a compuestos fenólicos y (en menor medida) a polisacáridos de proteínas ricas en prolina.

El ingrediente principal a partir del cual se elabora la cerveza es la cebada. El contenido de proteína de la cebada es de 8-15% s.s., siendo las hordeinas las más abundantes (40-50% de las proteínas, según Osman y col, 2002). Estas hordeinas se pueden clasificar en 4 grupos, denominadas B, C, D, y γ hordeinas. B (30-45 KDa) y C (45-75 KDa) representan 70-80% y 10-12 % de las hordeinas, siendo D, y γ las minoritarias (Silva y col 2007).

Las hordeinas, prolaminas solubles en alcohol ricas en prolina (20%mol), están implicadas junto con ciertos compuestos fenólicos en la formación de los denominados “turbios” (partículas en suspensión) de la cerveza, unidas a polifenoles y/o polisacáridos.

En la cerveza podemos encontrar una compleja mezcla de **compuestos fenólicos** procedentes de la malta (cebada) y del lúpulo (*Humus lupulus L.*) El lúpulo a pesar de encontrarse en una proporción 100 veces menor que la malta proveniente de la cebada, puede proporcionar hasta un 30% de los polifenoles totales de la cerveza (Callemien y col, 2005).

Cerca del 80 % de los polifenoles de la cerveza provienen de la *malta de cebada*. Los flavan-3-oles constituyen el grupo mayoritario de polifenoles en la cebada, sin embargo el malteado produce pérdidas en la concentración de compuestos fenólicos (Goupy, 1999), probablemente debido al fuerte tratamiento térmico, siendo este grupo (flavan-3-oles) el más afectado. Los flavan-3-oles pueden aparecer como monómeros (catequina, epicatequina), dímeros (prodelphinidina B3 y procianidina B3) y trímeros como procianidina C2. Los más abundantes son los dímeros; aunque también se han llegado a describir la presencia de otros flavonoides derivados de los taninos, de mayor peso molecular (Herranz y col 2001).

Los flavan-3-oles y más concretamente las proantocianidinadas (dímeros y trímeros) son los compuestos fenólicos que pueden unirse o crear algún tipo de interacción (son uniones que se pueden

romper) con las proteínas generando turbidez, coloides, o dependiendo del tamaño incluso partículas que pueden llegar a sedimentar (Siebert, 2006); mientras que los ácidos fenólicos y más concretamente los hidroxicinámicos como cumárico y ferúlico suelen aparecer unidos a pentosanos como arabinosilanos (Kroon y Williamson, 1997). Por tanto podemos deducir que si los arabinosilanos forman parte de la fibra soluble de la cerveza, los compuestos fenólicos que estén unidos a ellos, también lo sean.

Del mismo modo se deben tener en cuenta (aunque sean minoritarias) las interacciones o uniones de algún tipo entre proteínas y ciertos hidratos de carbono (que pueden formar parte de la fibra soluble o no).

Para ello el objetivo de este trabajo ha sido la determinación de fibra (polisacáridos no digeribles) en cerveza y de compuestos fenólicos asociados así como su capacidad antioxidante y proteína resistente (no digeribles) asociada a la matriz de fibra.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS.

Para llevar a cabo este estudio, se analizaron las tres clases de cerveza (con alcohol rubia, sin alcohol, y cerveza negra) más consumidas en la dieta española:

Cerveza Rubia: Mahou 5 estrellas, 5.5% (vol). Contiene malta de cebada. Mahou S.A. Pº Imperial 32, Madrid.

Cerveza sin alcohol: San Miguel 0.0. Ingredientes principales: malta de cebada, agua y lúpulo. San Miguel, fábricas de cerveza y Malta, S.A.. Urgell, 240. Barcelona.

Cerveza Negra: Mahou Negra. Cerveza especial 1890. 5.5 % (vol). Contiene Malta de cebada. Mahou S.A. Pº Imperial 32, Madrid.

2. MATERIALES Y EQUIPOS ESPECÍFICOS.

Los materiales y equipos empleados han sido los mismos que se describen en el capítulo “materiales y métodos” y Baño de Ultrasonidos (Sonicador) Ultrasonics H. Selecta

3. MÉTODOS

Para aislar el complejo de fibra dietética soluble, en la cerveza se ha empleado el método descrito detalladamente en el capítulo dedicado a la metodología. Recordemos que este método incluía 4 pasos fundamentales: preparación de la muestra , tratamientos enzimáticos, diálisis y finalmente la determinación de la fibra dietética soluble y compuestos asociados en el complejo de fibra dietética soluble obtenido tras la diálisis (Saura-Calixto et al. 2002; Diaz-Rubio & Saura-Calixto 2006). En el caso de la cerveza la preparación de la muestra incluye no solo concentrar la muestra, si no también un paso previo consistente en su desgasificación mediante un sonicador.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La cantidad de fibra dietética soluble de las cervezas mas consumidas en España (rubia, negra y sin alcohol) se muestra en la tabla 4. La fibra dietética soluble parece ser un importante constituyente de la cerveza, encontrándose en mayor concentración que vitaminas, minerales, compuestos fenólicos, e incluso proteínas. Probablemente solamente el agua, el alcohol y dextrinas (digeribles), se encuentren en mayor concentración

La concentración de fibra soluble de la cerveza negra es mayor (3.54g/L) que la encontrada en la cerveza rubia (2.08g/L) y en la cerveza sin alcohol (2.08g/L).; Las diferencias en el método de elaboración de cada tipo de cerveza (el tostado , malteado), y la materia prima empleada (solamente cebada o tambien adjuntos como arroz, maiz, trigo) deben ser la causa de las diferencias en los contenidos de fibra.

Tabla 4. Contenido y composición de la fibra dietética soluble de cerveza

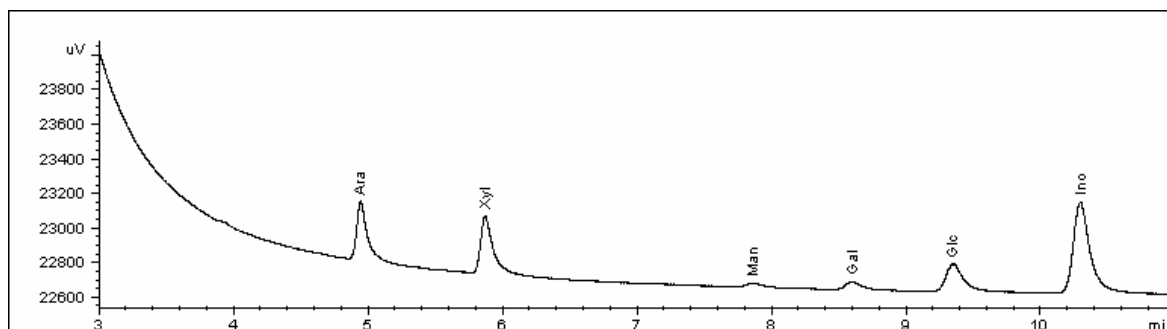
	TIPO de CERVEZA		
	Sin alcohol	Rubia con alcohol	Negra
FDS ^a (g/330ml) ^b	0.36 ± 0.009	0.68 ± 0.01	1.168 ± 0.006
FDS (g/L)	1.09 ± 0.06	2.08 ± 0.04	3.54 ± 0.02
COMPOSICION FDS			
Ac. Urónicos (g/L cerveza)	0.0303 ± 0.001	0.026 ± 0.0007	0.029 ± 0.0008
Az. Neutros (mol%)			
Glucosa	22.77 ± 0.78	23.95 ± 1.55	56.18 ± 2.45
Galactosa	5.61 ± 0.4	7.56 ± 0.24	2.77 ± 1.50
Manosa	3.44 ± 0.09	7.92 ± 0.21	3.38 ± 0.09
Xilosa	37.47 ± 2.43	32.64 ± 1.64	20.72 ± 0.87
Arabinosa	30.67 ± 0.79	27.91 ± 1.79	16.95 ± 0.58
Ramnosa	nd	nd	nd

^aFDS=Fibra dietética soluble. ^bFDs expresada como g de glucosa/lata de cerveza

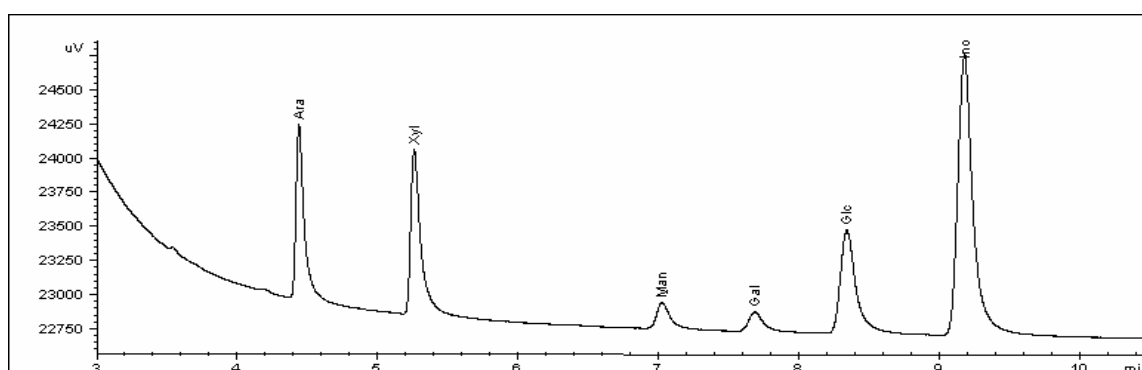
Este trabajo no tiene como objeto el estudio de los factores tecnológicos que influyen en el contenido de fibra, sino determinar el contenido de fibra. Por ello se han llevado a cabo las determinaciones en los tipos y marcas de cerveza de mayor consumo a nivel nacional

Figura 4. Cromatogramas de Az. Neutros de la FDs de las cervezas.

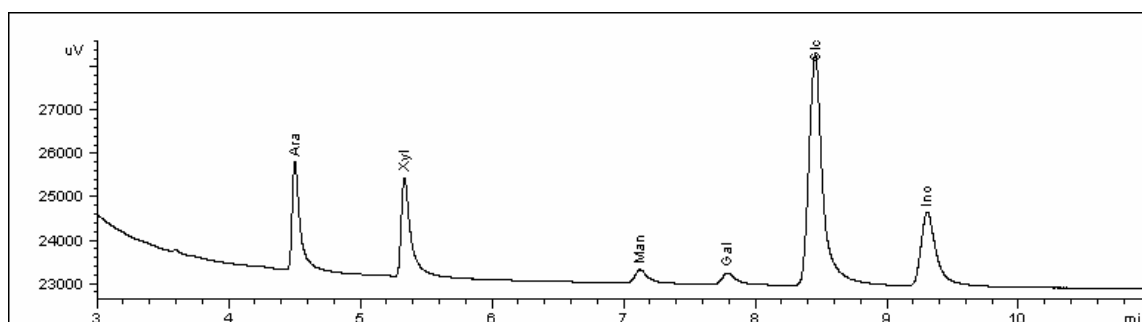
Cerveza sin alcohol (0.0%)



Cerveza Rubia con alcohol



Cerveza Negra con alcohol



La composición de la fibra se ha determinado por cromatografía de gases, a partir de los acetatos de alditol de los azúcares constituyentes (Figura 4); de los azúcares determinados la xilosa (20.72-37.47 mol%), arabinosa (16.95-30.67 mol %) y glucosa (22.77-56.18 mol%) son los principales constituyentes de los polisacáridos de la fibra dietética soluble de la cerveza (tabla 4). Estos datos parecen indicar que arabinoxilanos y β -glucanos, son los polisacáridos mayoritarios de la fibra de la cerveza. Aunque no

debe descartarse la presencia de arabinogalactatanos , procendentes tambien del grano de cebada (Cyran, y col. 2002).

Los ácidos urónicos proceden en su mayoría de cadenas laterales de ácidos glucurónicos y alguna mínima proporción puede deberse a alguna modificación en la cadena de algun arabinoxilano. (Oscarsson, y col. 1995).

Manosa y galactosa en su mayoría estan originados por residuos de glucomananos y pequeñas cantidades de galactanoproteinas ó arabinogalactanoproteinas (AGP). (Bacic y Stone, 1981)

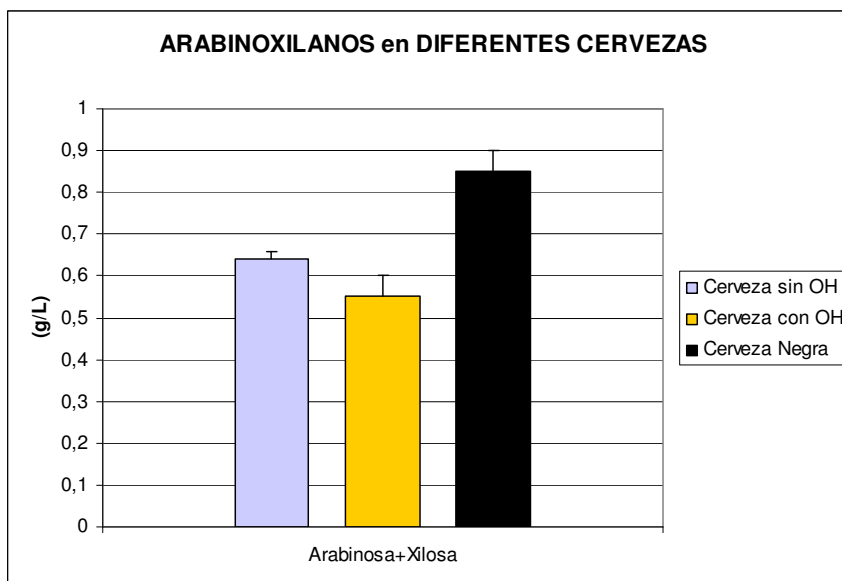
Excepto en el caso de la cerveza negra, el contenido en arabinoxilanos es mayor que el β -glucanos , dato que se corresponde con el estudio realizado por Jee Yup Han y col. (2000), en el que determinaron el contenido de arabinoxilanos y β -glucanos de diferentes cervezas rubias elaboradas con distintas variedades de cebada .

Por otra parte, el almidón (49,4-66.2 %s.s.) y la fibra dietética (13.6- 27.5%) son los principales componentes del grano de cebada. La fibra dietética de la cebada contiene a su vez entre 3-7% β -glucanos, 4-11% de arabinoxilanos así como pequeñas cantidades de celulosa, lignina, galactomananos, (Oscarsson y col 1995) Los Arabinoxilanos a diferencia de los β -glucanos, se encuentran mayoritariamente en la capa de aleurona (Bacic y Stone, 1981). Tanto en el grano de cebada como en el resto de cereales podemos diferenciar los arabinoxilanos en dos grupos, aquellos que son fácilmente extraíbles con agua y aquellos que no lo son (Holtekjolen y col 2006); La diferencia en el contenido de arabinoxilanos entre las diferentes cervezas analizadas (figura 5) viene marcada por el grado de sustitución del esqueleto de xilosa y por el tipo o variedad de cebada empleada, así como el empleo o no de otros cereales o adjuntos en el proceso de elaboración.

En ninguna de las cervezas empleadas en el estudio se especifica el tipo, variedad o clase de cebada empleada , ni si se usaron otros cereales (malteados o no).

Por otra parte en el caso de la cerveza sin alcohol, otro factor a destacar sería el método empleado para desalcoholizar la bebida, si se emplearon levaduras con baja capacidad de fermentación o bien se detuvo la fermentación en cierto momento, o se llevó a cabo el proceso tradicional , para luego proceder a la desalcoholización de la bebida.

Figura 5. Arabinoxilanos presentes en la FDS.



La glucosa deriva principalmente de los β -glucanos, aunque en el caso de la cerveza negra, buena parte pueda provenir de las melanoidinas formadas durante las primeras fases del proceso de elaboración de la cerveza.

Los compuestos de Maillard pueden estar incluidos en los valores de fibra dietética soluble de la cerveza negra. Durante el tostado y/o malteado de la cebada(temperaturas entre 80°C-250°C) y la posterior cocción del mosto, dan lugar a las denominadas reacciones de Maillard, reacciones que se producen entre azúcares y ciertas proteínas, con formación, entre otras sustancias de melanoidinas que influirán sobre el color, sabor, y aroma finales de la cerveza. Existen fundamentalmente dos clases de melanoidinas (Cammerer, y col.2002): melanoidinas formadas por carbohidratos oligoméricos y aminoácidos y melanoidinas generadas por reacción entre aminoácidos con mono- o disacáridos; ambos tipos tienen un comportamiento similar en condiciones de hidrólisis ácida, rompiéndose y liberando azúcares, fundamentalmente en forma de glucosa (Cämmerer y col.. 2002).

Las concentraciones de los compuestos resultantes de las reacciones de Maillard y caramelización de azúcares, son relativamente bajas en maltas poco tostadas mientras que su concentración aumenta significativamente en cervezas de malta mas tostada (cerveza negra) (Vanderhaegen y col 2006).

Para estudiar estos compuestos se han publicado diversos estudios a partir de la elaboración de diferentes mostos con distintas maltas oscuras y evaluada mediante diversas técnicas. El fraccionamiento

por ultrafiltración y cromatografía de impregnación de gel, reveló la existencia de dos grupos de productos generados durante la reacción de Maillard, un grupo que contenía compuestos de peso molecular bajo (BPM) y otro contenía compuestos de peso molecular alto (APM) (Coghe y Adriaenssens, 2004). En maltas pálidas, los escasos compuestos de reacción de Maillard que aparecían eran de BPM (menos de 10KDa), los colorantes de maltas café caramelo eran de APM y BPM, mientras que la malta horneada negra originó casi exclusivamente compuestos de elevado peso molecular (superiores a 100KDa). En este último caso se encontraría la cerveza negra analizada. Tendría melanoidinas que al no ser degradadas por las enzimas digestivas y con ese peso molecular no atraviesan la membrana de diálisis y se cuantifican como fibra. En este punto podemos explicar este concepto de dos maneras, o bien estamos sobrevalorando la fibra, porque cuantificamos las melanoidinas como tal o bien, según la última definición aceptada de fibra, podría decirse que este tipo de melanoidinas de alto peso molecular se considerarían fibra dietética.

En la tabla 5 se muestra el contenido total de compuestos fenólicos (método Folin Ciocalteu) de las cervezas analizadas, así como la concentración de los grupos fundamentales (cromatografía líquida de alta eficacia, "CLAE" o "HPLC"). Estos resultados se correlacionan con los datos bibliográficos (Goupy y col 1999, Naczki y Shahidi, 2006, Holtekjolen y col. 2006,).

Tabla 5. Polifenoles determinados en las cervezas seleccionadas

		TIPO de CERVEZA		
		Sin alcohol	Rubia con alcohol	Negra sin alcohol
Método Folin-Ciocalteu	PP totales ^a	299 ±1.4	312.1±2.8	585±19
Método CLAE^b	Acidos Benzoicos	52.6 ±1.3	20.01 ± 0.8	23.6±0.9
	Ac. Hidroxicinámicos	19,8 ±0.7	15.44±0.5	6.5±0.3
	Flavonoides ^c	27,6 ±1.1	64.5±2.2	69.8±3.1

^a Polifenoles totales expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de cerveza.

^b Polifenoles determinados por CLAE agrupados en los 3 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por CLAE.

^c Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas.

La concentración de polifenoles totales en la cerveza negra (585 mg/L de cerveza) es mayor que en cerveza rubia con alcohol , principalmente por la generación de compuestos de Maillard durante el tostado. La reacción del método Folin-Ciocalteu tiene interferencias generadas por diversos compuestos, como aminoácidos, melanoidinas o compuestos de Maillard (Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2007). Esta mayor concentración también se debe a que el mayor tiempo de tostado y de cocción pueden dar lugar a la liberación de ácidos unidos a ciertos polisacáridos (como ácido ferúlico), que se transforman en fenoles simples que aportan aroma a la cerveza (Samaras y col 2005) . La cerveza negra tiene mayor

concentración de flavonoides (catequinas, proantocianidinas), que los otros dos tipos de cerveza, datos que coinciden con la literatura (Rivero y col. 2005).

La cerveza sin alcohol tiene menos compuestos fenólicos que las demás, esto es atribuible a las diferencias en la duración de la fermentación, el tipo de levadura empleado o al proceso que suele utilizarse en dealcoholizar. Este tipo de procesos suelen afectar fundamentalmente a los polifenoles acidos, como cafeico, cumarico o vainillinico (Alonso Garcia y col 2004)

Los polifenoles de la cerveza (principalmente los ácidos hidroxicinámicos) suelen encontrarse unidos a los pentosanos (arabinosilanos), de las paredes celulares de la cebada. Según esta tesis los arabinosilanos forman parte de la fibra dietética de la cerveza, por tanto es de esperar la presencia de polifenoles asociados a la fibra, que le otorgaran propiedades antioxidantes (tabla 6)

Tabla 6. Polifenoles de la cerveza y asociados a la Fibra. Capacidad Antioxidante

			TIPO de CERVEZA		
			Sin alcohol	Rubia con alcohol	Negra con alcohol
CERVEZA	PP Totales ^a		299 ± 1	312 ±3	585 ± 19
	Actividad Antioxidante	FRAP ^b	1205±46	1268±50	3165±18
		ABTS ^b	639±27	654±23	1060±10
SOLUCION de FDS ^c	PP Totales Asociados ^{a,d}		52 ±1	66±2	140 ± 1
	Actividad Antioxidante	FRAP ^b	320±5	328±4	1189±20
		ABTS ^b	257±7	262±16	785±8

^a Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de cerveza.

^b Capacidad antioxidante expresada en µmolesTrolox /Litro de cerveza

^c Solución de Fibra dietética soluble.

^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble. determinados por método Folin-Ciocalteu

Los polifenoles cuantificados en la disolución de fibra soluble, deben estar asociados a la fibra, si no lo estuvieran, debido a su pequeño tamaño molecular (desde el ácido ferúlico con un tamaño de 194.12 Da hasta la catequina o epicatequina con 290.3), atravesarían la membrana de diálisis (12000 – 14000 Da) empleada en el método para simular la digestión. De la tabla 6, se deduce que entre 76-82% son polifenoles que se encuentran libres, o bien unidos a proteínas que durante el proceso de simulación de la digestión han sido atacadas por la pepsina, rompiéndolas y convirtiéndolas en péptidos o proteínas menores de 12000 Da, mientras que entre 17-24% se encuentran unidos de alguna manera a la fibra.

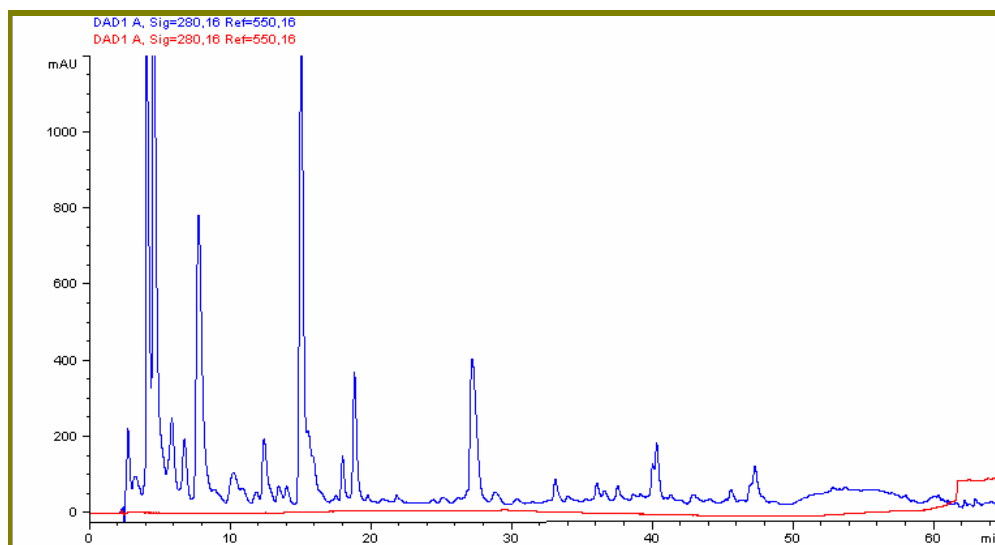
Como se observa de la tabla 6 estos polifenoles asociados se pueden cuantificar espectrofotométricamente, pero cuando se utilizaron técnicas cromatográficas (CLAE), el cromatograma

obtenido era plano (figura 6a,6b, 6c), ;sin embargo sabemos que existen no solo por los resultados de capacidad antioxidante que se correlacionaban con los polifenoles determinados usando el método de Folin- Ciocalteu. $R=0.9805$ usando método FRAP y $R= 0.9808$ con el método ABTS).

Figura 6. Cromatogramas^a de las cervezas seleccionadas y de sus soluciones de Fibra.

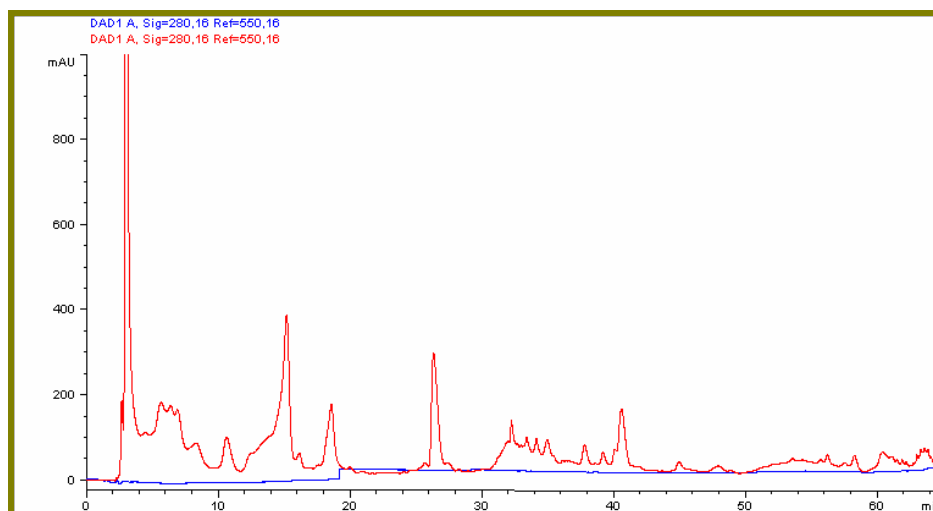
^a Se muestran solo las superposiciones de los cromatogramas realizados a $\lambda=280\text{nm}$, ya que con el método empleado es la longitud de onda a la cual absorben todos los compuestos fenólicos en mayor o menor medida.

Figura 6 a. Cerveza sin alcohol.^b



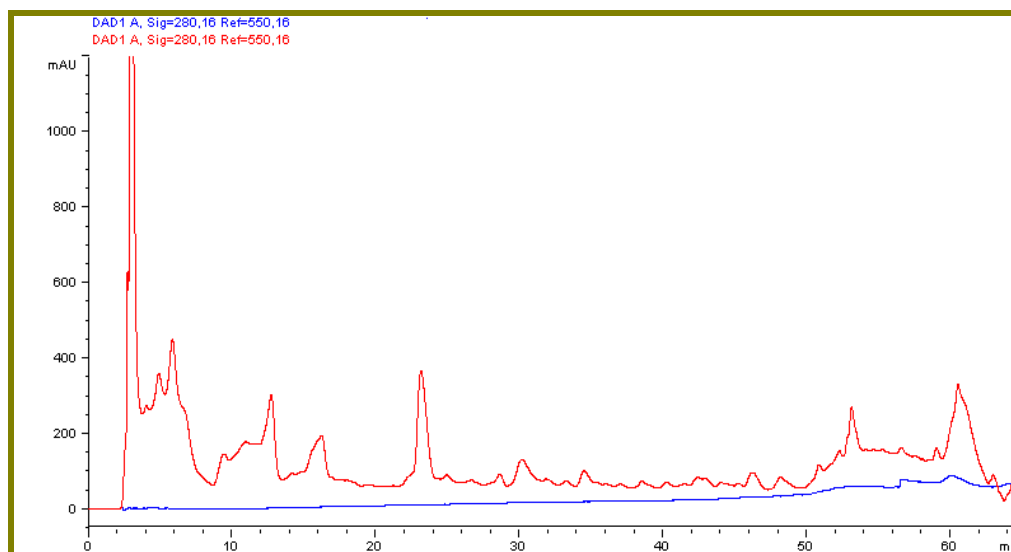
^b En color azul se aprecia el cromatograma de la cerveza sin alcohol ($\lambda=280\text{nm}$), frente al cromatograma (color rojo) que se obtiene a la misma longitud de onda cuando se analiza la solución de Fibra.

Figura 6b. Cerveza con alcohol^c



^c En color rojo se aprecia el cromatograma de la cerveza rubia con alcohol ($\lambda=280\text{nm}$), frente al cromatograma (color azul) que se obtiene a la misma longitud de onda cuando se analiza la solución de Fibra.

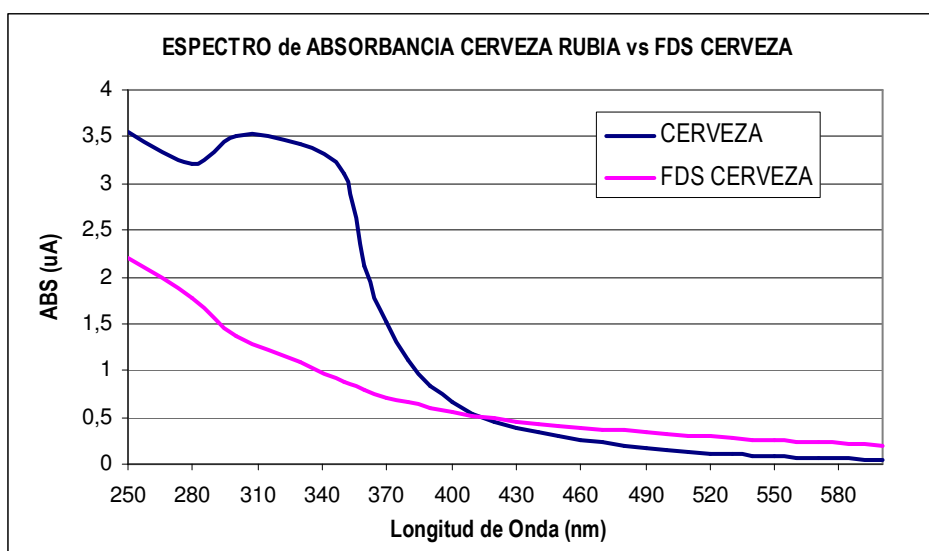
Figura 6c. Cerveza Negra^d



^d En color rojo se aprecia el cromatograma de la cerveza negra ($\lambda=280\text{nm}$), frente al cromatograma (color azul) que se obtiene a la misma longitud de onda cuando se analiza la solución de Fibra.

Del mismo modo, para confirmar una vez más la presencia de compuestos fenólicos asociados a la fibra, se realizó un barrido a diferentes longitudes de onda, se obteniéndose un espectro de absorción de la muestra que parece indicar la presencia de estos polifenoles. En la figura 7 podemos ver el espectro de la cerveza rubia con alcohol

Figura 7. Espectro de absorción de cerveza rubia y la correspondiente solución de fibra



Una de las características de las enzimas es su especificidad, y por tanto si quisiéramos saber realmente todos los polifenoles unidos y/o asociados (cantidad), así como como cuales son con exactitud,

sería necesario conocer todos y cada uno de los enlaces PP- Polisacárido de la fibra, para de este modo emplear la hidrólisis adecuada.

Cuando se llevó a cabo la hidrólisis de la Fibra soluble con la enzima celulasa, se determinaron de nuevo los compuestos fenólicos así como capacidad antioxidante (tabla 7) y se observa que con este tratamiento enzimático se liberaron algunos de los polifenoles unidos a la fibra.

Este hecho puede deberse a que la celulasa ha sido capaz de romper alguna de las uniones de los compuestos fenólicos con la fibra, lo cual a su vez nos podría dar una pista del tipo de uniones de los polifenoles con la fibra.

Tabla 7. Polifenoles totales, asociados y liberados por hidrólisis enzimática.

			TIPO de CERVEZA		
			Sin alcohol	Rubia con alcohol	Negra con alcohol
CERVEZA	PP Totales ^a	Método Folin-Ciocalteu	299 ± 1	312 ± 3	585 ± 19
		CLAE	227 ± 2	290 ± 8	529 ± 12
SOLUCION de FDS^c	PP Totales Asociados ^{a,d}	Método Folin-Ciocalteu	52 ± 1	66 ± 2	140 ± 1
		CLAE	nd	nd	nd
SOLUCION de FDS^c HIDROLIZADA^e	PP Totales Asociados Hidrolizados ^{a,d}	Método Folin-Ciocalteu	289 ± 3	154 ± 2	422 ± 17
		CLAE	100 ± 1	103 ± 4	227 ± 3
	Actividad Antioxidante	FRAP ^b	377 ± 16	342 ± 9	1264 ± 46
		ABTS ^b	281 ± 4	348 ± 14	856 ± 25

^a Polifenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de cerveza.

^b Capacidad antioxidante expresada en µmoles Trolox /Litro de cerveza

^c Solución de Fibra dietética soluble.

^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble. determinados por método Folin-Ciocalteu

^e Hidrólisis enzimática con celulasa

^f Polifenoles determinados por CLAE expresados en mg polifenoles totales determinados por CLAE/L de cerveza.

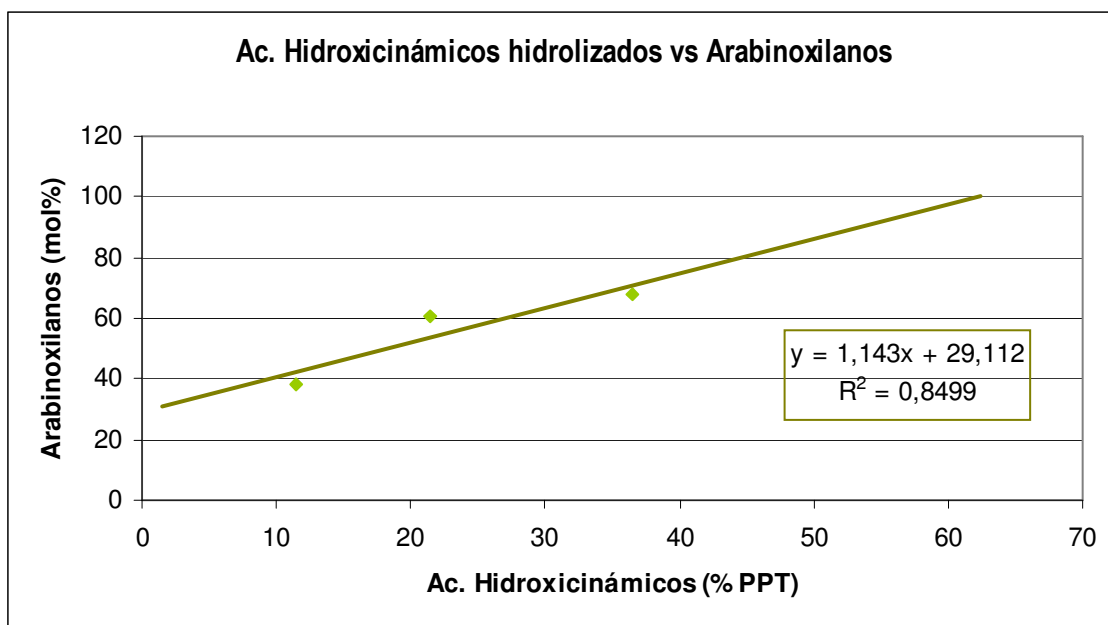
El mayor porcentaje de polifenoles que aparentemente es capaz de liberar la celulasa, se observa en la cerveza sin alcohol (95%). La cerveza sin alcohol tiene mayoritariamente polifenoles del grupo de los ácidos hidroxicinámicos (Alonso Garcia y col. 2004), que sabemos que suelen encontrarse unidos a los pentosanos (Holtekjolen y col 2006), mediante enlaces tipo éster; Es decir que probablemente mediante la hidrólisis enzimática con celulasa, se liberan la gran mayoría de compuestos fenólicos unidos a la fibra con este tipo de enlace. Al llevar a cabo este tratamiento enzimático en la solución de fibra, se pudieron identificar diferentes tipos de compuestos fenólicos por CLAE (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos o flavonoides) (tabla 7). De este modo se podría decir que los

polifenoles que se liberan en mayor cantidad mediante esta hidrólisis enzimática, son los flavonoides, seguidos por los ácidos hidroxicinámicos.

Como se ha comentado anteriormente, los polifenoles de la cerveza (principalmente los ácidos hidroxicinámicos) suelen encontrarse unidos a los pentosanos (arabinoxilanos), de las paredes celulares de la cebada.

Existe correlación significativa entre los ácidos hidroxicinámicos que se han podido liberar con la celulasa y la xilosa y arabinosa detectadas por cromatografía de gases en la fibra dietética soluble (FDS), que formarían los arabinoxilanos. (Figura 8).

Figura 8. Correlación entre Ac. Hidroxicinámicos “liberados” después de la hidrólisis con celulasa y los Arabinoxilanos que forman parte de la fibra.^{a,b}



^aLos arabinoxilanos se han calculado como la suma de arabinosa y xilosa.

^bLos Ac. hidroxicinámicos se expresan como porcentaje con respecto al total de polifenoles(PPT) hidrolizados con celulasa determinados por cromatografía.

Diversos estudios han detectado la presencia de dímeros de ácido Ferulico en arabinoxilanos aislados en la malta de cebada (Dervilly y col. 2002). El ácido ferúlico y el p-cumárico son los ácidos fenólicos mayoritarios en la cebada, principalmente en la capa de aleurona y en el pericarpio. Ambos se encuentran unidos a ciertos constituyentes de la pared celular, concretamente forman un enlace de tipo éster con los arabinoxilanos. Es común que las cadenas laterales de arabinosa estén sustituidas en posición O-5 por ácidos fenólicos (HolteKjolen y col. 2006).

Proteína Resistente. Del mismo modo se llevó a cabo la determinación de proteína resistente (tabla 8). Aproximadamente entre 41-78% es proteína no digerible, es decir, no sufrieron degradación por las enzimas empleadas en el método de análisis y por tanto forman parte de la fibra dietética.

Esta proteína junto con los pentosanos son las principales moléculas capaces de unirse a polifenoles. En el caso de los polisacáridos hemos visto que tienen afinidad por polifenoles ácidos, mientras que en el caso de la proteína datos bibliográficos (Siebert, y col., 1996) apuntan afinidad por ciertos flavonoides.

Tabla 8. Proteína y digestibilidad de proteína en las cervezas seleccionadas.

Tipo de Cerveza	Proteína en		Proteína Digestible (g/l)	Digestibilidad Proteína (%)	Proteína no digerible (%)
	Cerveza	Fibra ^a			
Sin alcohol	0.147±0.002	0.095±0.003	0.052±0.002	35	65
Rubia con alcohol	0.172±0.003	0.134±0.001	0.038±0.002	22	78
Negra con alcohol	0.193±0.001	0.079±0.002	0.114±0.002	59	41

^a Proteína determinada en la disolución de fibra, es decir cuantificada en la solución dializada tras los tratamientos enzimáticos, que permaneció dentro de las membranas de diálisis.

En nuestros análisis no se ha visto correlación entre los compuestos fenólicos asociados a la fibra y la proteína no digerible, lo que nos lleva a pensar de nuevo a que los polifenoles se encuentran en su mayoría asociados a los polisacáridos de la fibra.

Sin embargo si existe cierta correlación ($R=0.9018$) entre la galactosa (cuantificada mediante cromatografía de gases) que forma parte de ciertos polisacáridos de la fibra y la proteína no digerible; esto podría indicar la presencia de algún tipo de galactanoproteína (Bacic y Stone, 1981). Aunque este dato debería confirmarse empleando otros métodos de análisis de proteína, (concretamente métodos específicos de análisis estructural) ya que el método aquí empleado (método Bradford) adolece de falta de robustez y/o precisión para este tipo de muestras (Siebert, y col. 1996)

En definitiva parece que podemos hablar de la existencia de un complejo de fibra dietética (Fibra dietética soluble- polifenoles- proteína) en cerveza (Ver Anexo I microscopia electrónica de barrido, y anexo II fotos del complejo liofilizado), cuyas concentraciones son desde 3.78 g/l en la cerveza negra hasta 1.237 g/L para la cerveza sin alcohol, y 2.28 g/L en el caso de la cerveza rubia con alcohol

Este complejo posee entre 17-24% de los polifenoles totales de la cerveza y entre 75-65% de la proteína (figura 9). Es decir que del total de compuestos fenólicos que posee la cerveza no todos van a

ser absorbidos durante el tránsito intestinal. Entre el 17 y el 24% llegarán intactos al colon, mientras que los restantes fenoles (83-76%) cabe suponer que sean debidamente absorbidos y metabolizados.

Figura 9 a. Composición del complejo de fibra en la cerveza sin alcohol

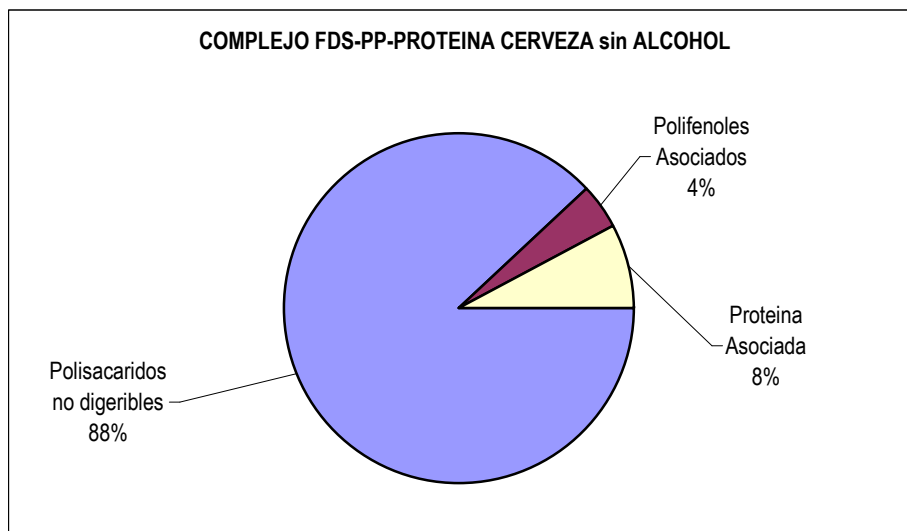
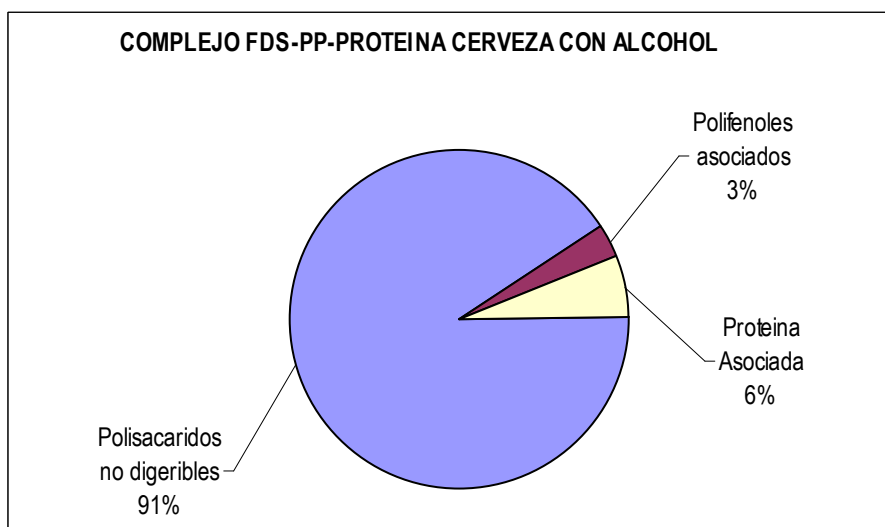
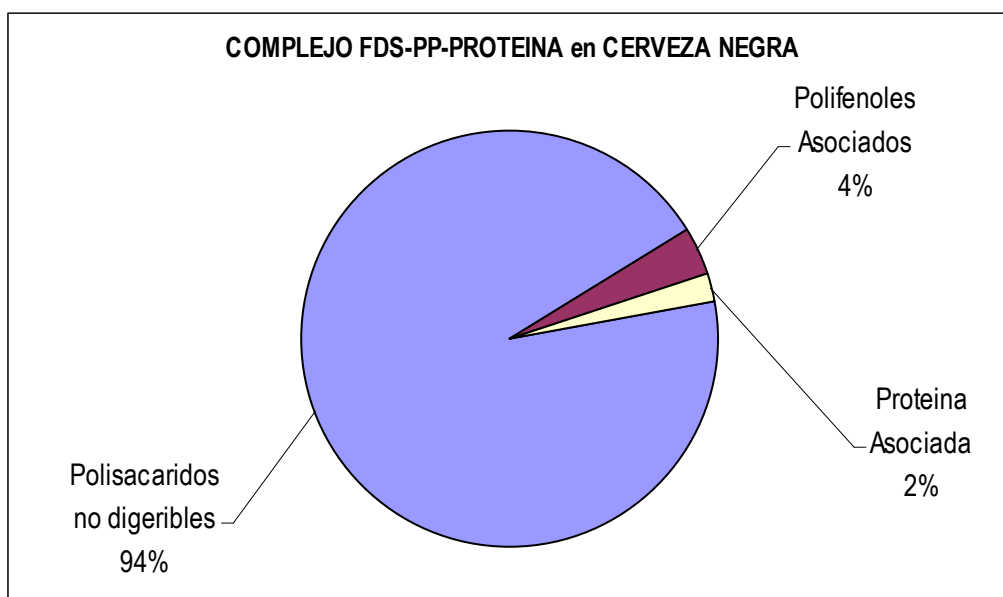


Figura 9b Composición del complejo de fibra en la cerveza rubia con alcohol



En las figuras 9 a, b, y c se observa claramente la proporción en que se encuentran cada uno de los componentes del complejo, polisacáridos no digeribles (Fibra soluble propiamente dicha), proteína y polifenoles. En todos los casos los polisacáridos no digeribles se presentan en mayor porcentaje, siendo el mayor en la cerveza negra; posiblemente debido a la cuantificación como fibra de ciertas melanoidinas

Figura 9 c Composición del complejo de fibra en la cerveza negra



Este complejo de fibra llegara intacto al colon, donde los polisacáridos seran fermentados por la microflora colónica, favoreciendo la liberación y posible fermentación de los polifenoles asociados. De este modo estos polifenoles y sus posibles productos de degradación pueden contribuir a crear un status antioxidante en el colon. y producir metabolitos de fermentación que se absorban y tengan efectos metabólicos y sistemáticos

En resumen

La cerveza presenta un contenido de fibra dietética soluble superior situado entre 1.09 g/L- 3.54 g/L, dependiendo del tipo de cerveza.

Arabinosilanos y beta-glucanos son los principales constituyentes de la FDS de la cerveza.

Entre el 17-24% de los compuestos fenólicos de la cerveza se encuentran asociados a la fibra dietética soluble, de los cuales entre el 50 y el 95% son liberados mediante hidrólisis enzimática con celulasa.

Entre el 41% y el 78% de la proteína presente en la cerveza es proteína resistente. El mayor porcentaje corresponde a la cerveza rubia.

I. ANTECEDENTES.

1. CAFÉ. DEFINICIÓN, OBTENCIÓN, ELABORACIÓN Y COMPOSICIÓN GENERAL

El café ("infusión de café") es una bebida preparada mediante la extracción de la materia soluble en agua caliente de los granos tostados y debidamente molidos que proceden del arbusto tropical llamado cafeto.

Esta definición de café (como bebida) está basada en las disposiciones del Real Decreto 1231/1988, que define en primer lugar el café como las semillas sanas y limpias procedentes de las diversas especies del género botánico «Coffea»; y en las subsiguientes modificaciones de este decreto, concretamente el Real Decreto 943/2001 del 3 de agosto que define extracto de café", "extracto de café soluble---, "café soluble" o "café instantáneo".-Es el producto concentrado obtenido por extracción de los granos de café tostados, utilizando solamente agua como medio de extracción, con exclusión de cualquier procedimiento de hidrólisis por adición de ácido o base. Además de las sustancias insolubles tecnológicamente inevitables y de los aceites insolubles procedentes del café, el extracto de café sólo deberá contener los componentes solubles y aromáticos del café.

El contenido de materia seca procedente del café deberá ser: a) Para el extracto de café: Igual o superior al 95 por 100 en masa.b) Para el extracto de café en pasta: Del 70 al 85 por 100 en masa.c) Para el extracto de café líquido: Del 15 al 55 por 100 en masa.

Teniendo en cuenta la definición de café como infusión, debemos distinguir al menos tres etapas hasta la obtención de una bebida de calidad: obtención de café verde, obtención café tostado, y elaboración de la bebida (café soluble, café expreso, café obtenido con cafetera de filtro,) (Belitz y col. 2004)

Obtención del café verde. Recolección y Beneficiado del café. El cafeto da 2 cosechas anuales de cerezas. En la cereza normalmente se encuentran 2 granos de café. Una vez recolectado el fruto (cereza) se realiza el denominado beneficiado del café, mediante el cual se obtiene el café verde o café crudo. El beneficiado es el conjunto de todas las operaciones que permiten liberar el grano del interior de la cereza, lo que se consigue eliminando la cáscara y mucílago del café cereza y secándolo hasta alcanzar una humedad del 12%.

Existen dos métodos o vías para realizar el beneficiado del café, mediante la vía seca o siguiendo el proceso de vía húmeda. Los cafés Robustas se extraen siempre por el método seco y Arábica de las dos maneras.

El Procesado en seco (Vía Seca) es el más antiguo y consta de 3 etapas básicas, clasificación, secado de la baya y descascarillado. Una vez recolectadas, las cerezas se extienden en superficies lisas al sol, removiéndose periódicamente para lograr secado uniforme; el secado mediante aire caliente es el sistema más empleado a gran escala en Brasil y también en África. Finalmente, tras el secado (3-4 meses de exposición solar o 3-4 días con aire caliente) se procede al descascarillado (eliminación de las cubiertas secas para liberar el grano de café).

Mediante el procesado Húmedo (Vía Húmeda) se consigue un café de mayor calidad. Primero se realiza una clasificación de las bayas en el momento de la recolección (función de madurez y tamaño), normalmente por flotación y/o cribado seguida del denominado despulpado (etapa más importante), momento en el que se obtiene el grano de café en pergamino, con adherencia mucilaginosas de la pulpa, las cuales se eliminan durante la etapa de fermentación, que suele durar unas 24 horas. Tras este periodo el café se deja secar hasta alcanzar un contenido en humedad de un 12%, momento en el que se retira el “pergamino”, empleando unas maquinas pulidoras, que le otorgan ese aspecto característico de “café lavado”.

Obtención del café tostado. Tostado, molienda y envasado. Tras el beneficiado del café la siguiente etapa el siguiente proceso es el tostado, con el que se persigue un doble objetivo, desarrollo del aroma y sabor debido a diversas y diferentes transformaciones químicas y facilitar molienda. Mediante el proceso de tostación a las temperaturas adecuadas (180-230°C), el contenido en agua se reduce hasta un 2% aproximadamente, se desencadenan grandes procesos físicos y reacciones químicas que conllevan una pérdida de masa de hasta el 18% con un aumento de volumen simultáneo por expansión hidrotérmica de hasta 20-35%, del mismo modo, durante el tostado se van a producir cambios químicos, macroscópicos y estructurales, estos cambios van a afectar a la composición tanto del grano como de la infusión .

Cuando se alcanza la tostación uniforme y correcta de todos los granos, el proceso se detiene para evitar una sobretostación. En ocasiones, antes de finalizar el tueste se añade azúcar en cantidades que normalmente no superan el 15% en peso. A la temperatura que se encuentra el bombo de tueste (200°C aproximadamente), el azúcar comienza a caramelizarse y forma una película quemada alrededor del café, generándose de esta manera el denominado café torrefacto.

Una vez tostado, el café en grano debe molerse. El objetivo de la molienda es aumentar la superficie de contacto del café con el agua para facilitar la extracción de las sustancias solubles y emulsificables a la bebida pero por esta misma razón también acelera la pérdida de volátiles, aromas y enranciamiento de los aceites por oxidación.

Finalmente, se envasa el café de manera adecuada; un café mal envasado provocará un prolongado contacto con el oxígeno que conducirá a fenómenos de añejamiento por oxidación de aldehídos y con ello pérdida de aroma, así como enranciamiento de aceites. También ocasionará un aumento en el contenido de humedad.

Elaboración de la infusión o bebida. Extracción. Es fundamentalmente un proceso físico que consiste en la transferencia de masa de los compuestos que pueden difundir de la fase sólida a la líquida, aumentando el rendimiento de la extracción al aumentar la temperatura del solvente (agua) y al disminuir el tamaño de partícula. El rendimiento disminuye al aumentar la intensidad del tueste y al aumentar la relación café molido: solvente.

La extracción no es un simple fenómeno de difusión sino que presenta dos fases: una primera fase de lavado en la que se extraen los solubles libres; las sustancias solubles de la superficie se disuelven instantáneamente y se transfieren al extracto y una segunda fase, denominada, fase de difusión. En esta fase se solubilizan las sustancias solubles de las partículas celulares. Sin embargo la fase que tiene verdadera importancia es la primera(fase de lavado), puesto que es cuando se obtiene más del 90% de sustancias solubles

En cuanto a la extracción del café para preparar infusiones a pequeña escala (hogar o restauración), existen diferentes técnicas o modalidades, de este modo las extracciones mas comúnmente empleadas son, además de café turco y el obtenido con la cafetera Italiana (Mocca):

Cafetera de Filtro, Eléctrica o de Goteo. Es el sistema más empleado en centro y norte de Europa y EEUU. La eficiencia de la extracción depende especialmente de la construcción de la cafetera de goteo y del tipo de molienda del grano empleado. El tiempo de extracción se puede considerar excesivo (de 7 a 8 minutos) y el paso de agua se encuentra muy focalizado en el centro. Se obtiene un café de sabor y aroma suaves.

Cafetera Expreso. El café expreso es un café extractado que se consigue a base de someter poca cantidad de agua a una alta temperatura y presión elevada. La presión de extracción del agua debe estar situada entre 8 y 9 bares, mientras que la temperatura ronda los 95-100°C. Con este sistema se permite la extracción de todos los coloides, aceites naturales, azúcares y proteínas.

El café soluble o instantáneo es un caso especial de extracción. El proceso de obtención comienza igual que los empleados en otros cafés, hasta que se llega al momento de la extracción. El café soluble (café instantáneo) se prepara mediante extracción del café tostado. Una vez molido (2-6mm) el café se puede someter a dos tipos ó métodos de extracción, el más empleado actualmente consiste en

una extracción mediante percoladores en batería. Las baterías consisten en tanques verticales o torres que contienen un lecho de café molido a través del cual se hace circular agua caliente.(200°C)y el extracto abandona la célula a una temperatura de 40-80°C. El otro método consiste en una extracción en masa mediante la cual, se produce un contacto libre entre el café molido y el agua caliente en tanques presurizados. En ambos casos, el posterior tratamiento consiste en una desecación por atomización o por liofilización.

El extracto de café obtenido, tendrá una composición diferente a la de los demás cafés tostados y molido.

El proceso que debe realizarse hasta la obtención de un café (infusión, instantáneo) de buena calidad es largo y tedioso. Durante este proceso el café pasa por diversos estadios, en los que su composición varía debido a los procesos a los que se somete. De este modo se comienza con el café verde, cuya composición varía de manera drástica al convertirse en café tostado, y finalmente obtenemos la bebida, cuya composición varía con respecto al grano tostado, principalmente en función de la solubilidad de sus compuestos (Spiller, 1998).

1. *Composición de café verde.* La composición del café verde está dominada principalmente por:

➤ Hidratos de Carbono, incluyendo polisacáridos (glucomananos, celulosa), disacáridos (sucrosa), monosacáridos (glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, manosa, xilosa). El azúcar libre mayoritario es la sacarosa, aunque también podemos encontrar trazas de arabinosa, galactosa ó ramnosa. En cuanto a los polisacáridos, representan el 40-50% de materia seca en el grano verde y comprende fundamentalmente celulosa, manano, arabinogalactano.

➤ Lípidos como triglicéridos (75%), esteroides, ácidos grasos (linoleic, linolénico, esteárico, palmítico), diterpenos pentacíclicos (Kahweol, cafestol), otros alcoholes terpénicos y ceramidas. La concentración de cafestol y Kahweol en la bebida será totalmente diferente a la determinada en café verde. Dependerá de el método de extracción.(Bonita y col 2007)

➤ Tocoferoles y tocotrienoles.

➤ Proteína y aminoácidos libres (asparagina, ácido glutámico, alanina, lisina). Las proteínas suelen estar libres o pueden encontrarse unidas a los polisacáridos de las paredes celulares. Pero son los aminoácidos libres los que más influyen la calidad organoléptica de la bebida final.

➤ Xantinas y alcaloides, como cafeína, teobromina, teofilina. De estos compuestos, el más importante es la cafeína, cuyo contenido varía según la especie (Robusta tiene más); sin embargo, además de la cafeína existen otras bases nitrogenadas, que a su vez pueden ser de dos tipos, aquellas que permanecen sin degradar aún después del tostado y aquellas que se descomponen con el tueste

➤ Compuestos fenólicos. El compuesto fenólico más importante en el café es el ácido clorogénico. Los granos de café verde tienen pequeñas cantidades de ácido quínico libre, pero la mayoría esta en forma de ésteres que reciben el nombre general de ácidos clorogénicos, siendo los más importantes el cafeoilquinico, feruloilquinico y cumaroilquinico. Además de estos compuestos, también hay otros fenoles como escopolina, ácido ferúlico ó ácido cafeico libres. También podemos encontrar proantocianidians pero no catequinas.

➤ Otros compuestos. Como ácidos carboxílicos, Ácido fosfórico, Compuestos volátiles (son reponsables del aroma y aumentan en gran medida durante el tostado), Vitaminas, minerales como potasio, magnesio, calcio, fósforo, plomo, cromo, zinc, cobre, níquel hierro.

2. *Composición del café tostado.* Durante este proceso los compuesto del café verde sufren cambios y transformaciones.

➤ Hidratos de carbono. Los cambios que se producen en estos compuestos, dependen en gran medida del grado de tueste. De esta manera los principales compuestos que surgen debido a la descomposición de monosacáridos y azúcares superiores son los furanos.

Durante el tostado la cantidad de monosacáridos que se forman a partir de los polisacáridos es limitada. Durante este proceso se forman anhídridos y “productos de condensación” poliméricos ; estos productos suelen estar unidos mediante enlaces covalentes a fragmentos de proteínas y a ácidos clorogénicos dando lugar a los llamados productos de Maillard o melanoidinas.

➤ Xantinas. Durante el tostado aumenta el porcentaje de cafeína debido a la pérdida de agua.

➤ Las proteínas con el tueste se desnaturalizan generando peptidos de menor peso molecular, pudiendo reaccionar posteriormente con hidratos de carbono (reaccion de Maillard) ó con los compuestos fenólicos. Por otra parte los aminoácidos libres se degradan (por reacciones de pirólisis o interaccionando con hidratos de carbono) quedando solamente trazas; Tanto prolina como hidroxiprolina (aminoácidos mayoritarios en la composición de proteínas que interaccionan con polisacáridos o polifenoles) pueden participar directamente en reacciones de Maillard.

➤Compuestos fenólicos. La cantidad detectable de ácidos clorogénicos disminuyen marcadamente durante el tostado; a partir del ácido cafeico se forma catecol y el ácido quínico generado se autodegrada produciendo catecol, pirogalol o ácido trihidroxibenzoico.

➤Otros compuestos. Se produce aumento en ácidos carboxílicos (aumentando la acidez); se generan multitud de compuestos volátiles (el café tostado tiene mas de 600 compuestos volátiles) y en cuanto a los lípidos cabe destacar que apenas se ven afectados por el tostado, tan solo es importante comentar la degradación de los terpenos a monoterpenoides.

Infusión de Café ó café soluble (instantáneo). Finalmente el café es una compleja mezcla de más de 1000 compuestos diferentes (Belitz y col. 2004) : hidratos de carbono, lípidos, compuestos nitrogenados, vitaminas, minerales, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos.

Los compuestos que se van a extraer del café tostado en condiciones adecuadas de presión y temperatura, tanto en la infusión como en la obtención del café soluble se dividen en compuestos volátiles (ácidos orgánicos, aldehidos, cetonas, ésteres y aminas) y compuestos no volátiles (cafeína, trigoleína, ácido clorogénico, otros fenoles, aminoácidos, hidratos de carbono, minerales)(tabla 1)

Tabla 1. Composición del café (bebida)^a

COMPONENTE	CANTIDAD(%s.s.)
Proteínas ^b	6
Polisacáridos	24
Sacarosa	0.8
Monosacáridos	0.4
Lípidos	0.8
Ácidos Volátiles	1.4
Ácidos no Volátiles	1.6
Ácidos Clorogénicos	14.8
Cafeína	4.8
Trigoleína	1.6
Acido nicotínico	0.08
Sustancias Aromáticas Volátiles	0.4
Minerales	14
Otros sin identificar	29.4

^aCafé Arábica, tueste normal, 50g/l.

^b Expresado como suma de aminoácidos tras hidrólisis ácida.

Aunque la cafeína es un componente mayoritario en el café, su cantidad es muy variable en la bebida final; una taza de café (150 ml) tiene concentraciones entre 30mg y 175mg, mientras que un café descafeinado solo cuenta con 5mg por taza.

Los alcoholes cafestol y kahweol al ser lípidos, su concentración varía mucho dependiendo de la manera de preparar el café. Mientras un café preparado empleando filtro solo tiene 0,1mg/100ml, cuando se prepara usando un filtro, la concentración puede alcanzar 18mg.

Mientras que durante el proceso de extracción, al aumentar la temperatura del agua también aumenta la solubilidad de la cafeína; en el caso de las proteínas, debido a la desnaturalización sufrida en el tostado el rendimiento de su extracción es muy bajo.

La concentración final de los hidratos de carbono va a depender del proceso de extracción empleado (la extracción a escala industrial aplicado al café soluble produce elevados rendimientos). Aunque se encuentran concentraciones significativas de polisacáridos, parte de ellos están unidos a productos de reacción de Maillard.

Durante el proceso de extracción y obtención del café instantáneo se produce una pérdida de compuestos volátiles que no ocurre al realizar una infusión.

En definitiva, los compuestos más fácilmente extraíbles durante la infusión son la cafeína, los polisacáridos y los compuestos de Maillard. Aunque los compuestos más estudiados debido a su impacto en la salud son cafeína, cafestol, Kahweol así como el ácido clorogénico y otros compuestos fenólicos (Bonita y col 2007)

2.HIDRATOS DE CARBONO Y FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE EN CAFÉ GRANO y CAFÉ BEBIDA

La importancia de los carbohidratos o polisacáridos en la bebida de café o infusión, es atribuible no solo a la elevada concentración que podemos encontrar en la semilla, sino también a los cambios que se producen en estos polisacáridos durante el proceso de tostado (Redgwell y Fischer, 2006).

En su composición el grano de café verde tiene una elevada cantidad de polisacáridos (tanto digeribles como no digeribles), alcanzando el 60% en peso seco (Oosterveld y col, 2003). Estos polisacáridos juegan un papel muy importante en la formación de compuestos de aroma durante el tostado y después en la viscosidad (cuerpo) de la infusión y en la estabilización de la espuma que se forma en el café expreso (Nunes y Coimbra, 1998).

Los polisacáridos predominantes en el grano verde, son la celulosa, arabinogalactano (tipo II) y galactomananos.

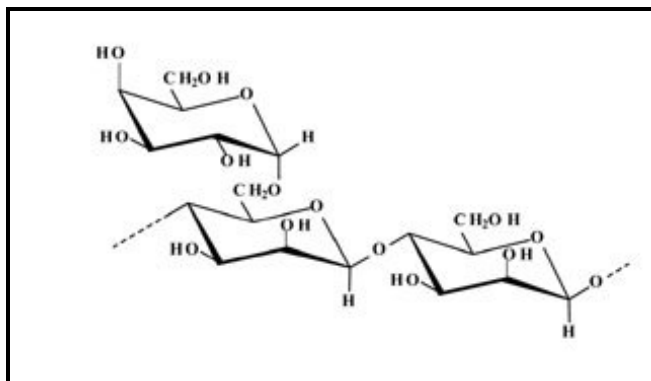
La celulosa, está formada por β -D-(1-4) glucanos, se presenta en cantidades del 5% s.s. La estructura de la celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucosa a través de enlaces β -1,4-glucosídico, lo que hace que sea insoluble en agua. Es una hexosana que por hidrólisis da glucosa. Tiene peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n=200$.

El galactomanano (polisacárido que confiere dureza al grano de café) realmente es una cadena de β -(1-4) manano con cadenas laterales de galactosa unidas en posición α -O-6. Al hidrolizarse, este galactomanano libera manosa galactosa y pequeñas cantidades de glucosa.

La presencia de cadenas laterales de galactosa aumentan la solubilidad de los galactomananos del café (Redgwell y Fischer 2006).(Figura1)

El arabinogalactano se encuentra en el café verde en una concentración de 8.5% s.s y consta de L- arabinosa y D- galactosa en una relación de 2:5. Al hidrolizarse, el arabinogalactano genera arabinosa, galactosa, así como pequeñas cantidades de manosa y ramnosa.

Figura 1. Galactomanano

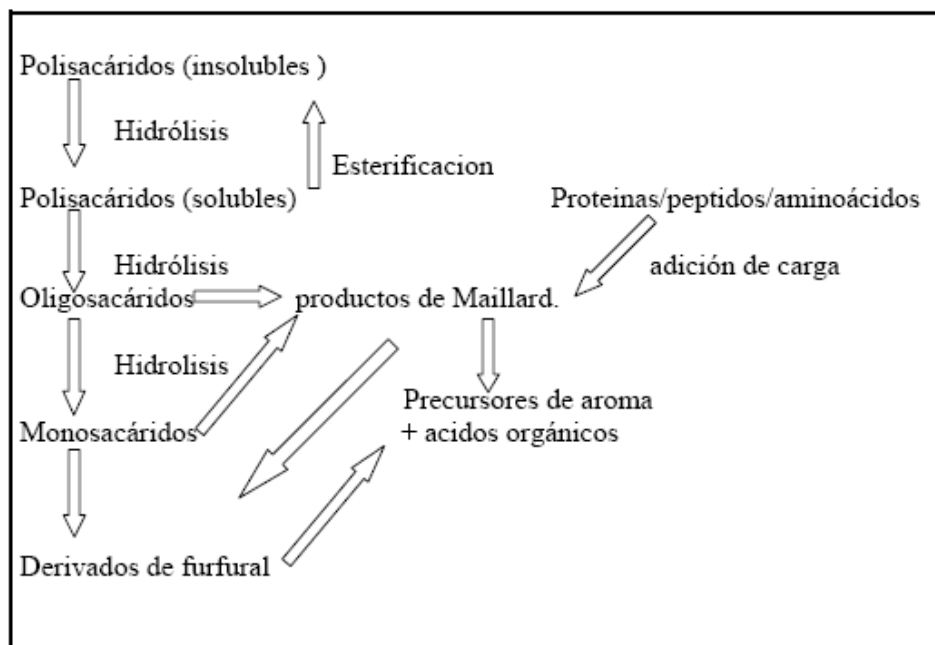


Fuente: Matsuhiro y col. 2006

Redgwell y col., en 2002 aportaron mas información acerca de la estructura de los arabinogalactanos del café verde; en primer lugar la presencia de cierta carga negativa y en segundo lugar, que gran parte de estos arabinogalactanos realmente son arabinogalactanoproteínas (AGPs). Estos AGPs forman una molécula verdaderamente compleja debido a la presencia de ácido glucurónico en forma de cadenas laterales, alcanzando un tamaño molecular de hasta 650kDa.

Con el tostado del café, se producen las reacciones de conversión más importantes que afectan a los polisacáridos del café; se liberan monosacáridos que son precursores del aroma y se produce una pérdida notable de polisacáridos (figura 2). Estas pérdidas están directamente relacionadas con la intensidad del tostado, a mayor intensidad, mas polisacáridos se degradan (Redgwell y col, 2002).

Figura 2. Efectos del tostado en los polisacáridos del café



Este proceso de tostado también da lugar a una disminución en el peso molecular de los polisacáridos extraíbles en agua, debido fundamentalmente a la ruptura de la mayoría de las cadenas laterales de arabinogalactanos y algunas de las de los galactomananos (Leloup y Liardon, 1993), aumentando la solubilidad de los galactomananos (tabla2). El extracto en agua de café arábica tostado tiene un 68% s.s. de polisacáridos (Redgwell y col, 2002).

Realmente en el tostado la cantidad de monosacáridos que se forma (y permanecen como tales) a partir de los polisacáridos es muy limitada; una cantidad relativamente alta de azúcares se pierden (especialmente arabinosa) debido a formación de productos de condensación poliméricos y de complejos como melanoidinas y productos de Maillard (compuestos de color pardo que aparecen durante reacción de pirólisis o en caramelización de hidratos de carbono).

Finalmente, sobre el grano tostado se realiza la extracción con agua para obtener la infusión o bebida de café. La temperatura en este proceso vuelve a ser una variable importante, al aumentar la temperatura aumenta la proporción de arabinogalactanos que se extraerán (Oosterveld y col 2003), a

170 ° la concentración de arabinogalactanos que se extraen es mayor que galactomananos, sin embargo a 90-100° se extraen mas galactomananos que arabinogalactanos.

Tabla 2. Cambio en composición de carbohidratos durante el tostado

Composicion de los Hidratos de carbono (mol%)	Café verde	Café tostado
Ramnosa	1	1
Arabinosa	12	6
Xilosa	2	0
Manosa	43	51
Galactosa	23	21
Glucosa	15	16
Ac. Uronicos	4	4

Fuente: Oosterveld y col. 2003

3. COMPLEJO DE FIBRA DIETÉTICA: POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES Y COMPUESTOS ASOCIADOS.

Los principales polisacáridos que se encuentran en el café son galactomananos arabinogalactanos (concretamente AG. tipo II). Estos AG y GM , forman parte de la fibra dietética (De Vries, 2004; Gniechwith y col, 2007) El hecho de que en la infusión existan mayor cantidad de galactomananos que arabinogalactanos, está directamente relacionado con los cambios que se producen en la pared celular del grano durante el tostado. Los arabinogalactanos del café verde se solubilizan más fácilmente que galactomananos ya que estos últimos se encuentran fuertemente retenidos en la pared celular del grano. Sin embrago durante el tostado, se produce una ruptura y degradación de estas paredes celulares liberando la mayor parte de estos galactomananos. (Redgwell y col 2002).

En cuanto al café instantáneo, diversos análisis han revelado la presencia de pequeñas cantidades de arabinosa, galactosa, manosa, y trazas de otros azúcares como sacarosa, xilosa y ribosa. Las cantidades de arabinosa, galactosa y manosa en el café instantáneo son significativamente mayores que las de los granos simplemente tostados, ello es debido fundamentalmente a la hidrólisis del arabano durante la extracción a temperaturas mayores de 100°C.

Existen diversos estudios centrados en los polisacáridos del café, pero hasta ahora estos trabajos estaban focalizados en sus cambios estructurales durante el tostado (Clifford, 1985; Redgwell y col. 2002), las propiedades organolépticas que aportan a la bebida (Nunes y Coimbra,1998), participación en reacciones de Maillard (Andriot y col, 2004); sin adentrarse ninguno de estos estudios en

la posibilidad de que alguno de estos polisacáridos, fuesen polisacáridos no digeribles, que forman parte de la fibra dietética, en el caso de la infusión fibra dietética soluble (FDS) y en el grano FDS y Fibra Dietética Insoluble(FDI). Del mismo modo algo similar ha sucedido con los posos que sobran cuando se realiza la infusión, en este caso los trabajos son más escasos, tan solo existen estudios que insinúan su posible uso como fertilizante o combustible (Martínez Pons y Álvarez Rabanal, 004), y alguna referencia algo mas interesante de fermentación colónica de cierta hemicelulosa insoluble previamente aislada del grano (Asano y col 2003).

Por ello es necesario obtener mas información, no solo de la composición de esta fibra, si no también de sus propiedades fisiológicas y nutricionales, Asi como de la posible existencia de un complejo fibra dietética formado por POLISACÁRIDOS NO DIGERIBLES(fibra propiamente dicha) -POLIFENOL-PROTEINA; complejo que proviene del grano tostado y molido que en el proceso de elaboración de la infusión, pasa casi de manera íntegra (depende del tipo de infusión) a la bebida permaneciendo la parte insoluble de la fibra en los posos sobrantes en la cafetera.

Como se ha comentado anteriormente, el café es una bebida de composición compleja debido a la cantidad de variables que inciden en su elaboración. De este modo además de la cafeína ó los polisacáridos, existen otros compuestos que se pueden extraer del café al elaborar la bebida ,con interesantes propiedades fisiológicas y/o nutricionales. Como son los compuestos fenólicos y la proteína.

En cuanto a **las proteínas**, es importante destacar que realmente se ha prestado muy poca atención a la presencia de proteínas en el grano de café verde. Las proteínas estan libres en el citoplasma ó unidas a polisacáridos de la pared celular; sin embrago los aminoácidos libres en el grano verde son más importantes que la proteína, por su influencia en la calidad organoléptica de de la bebida final, a pesar de encontrarse en poca concentración (0.15- 0.25% s.s.).

Además de la presencia de proteínas formando parte de las arabinogalactanoproteínas, existe una proteína fundamental en el grano de café, es la denominada proteína de almacenamiento 11S, proteína fácilmente hidrolizable y soluble, y por tanto una verdadera fuente de aminoácidos y proteínas para el café. Esta proteína esta formada por 2 grandes subunidades, la subunidad α con un tamaño molecular de aproximadamente 32kDa y la subunidad β (22kDa) (Rogers y col. 1999)

Al tostarse el café, las proteínas se desnaturalizan y se degradan a compuestos de menor peso molecular, ó algunos pueden reaccionar con hidratos de carbono (reacciones de Maillard), o interactuar con compuestos fenolicos (Montavon 2003), . La pérdida de proteínas durante el tostado ronda el 30%.

La proteína 11 S tiene un proceso específico de degradación que incluye generación de fragmentos con actividad antioxidante transitoria (Montavon y col 2003) y cierto grado de polimerización con ACG.

Finalmente las proteínas que logran extraerse en el café bebida es muy baja (0.5%-5% s.s.), debido a su escasa solubilidad. Sin embargo se puede suponer que al preparar la infusión parte de estas proteínas solubles se encuentren polimerizadas con los ácidos clorogénicos o con ciertos polisacáridos (sin ser reacción de Maillard) (Montavon 2003), formando parte del complejo de FDS no digerible, es por ello que la determinación de la proteína resistente se convirtió en otro objetivo importante en este trabajo.

Diversos autores han descrito la composición fenólica del café (Risso y col. 2007; Farah y Donangelo, 2006, Clifford y col. 2006); de esta manera mientras que los taninos condensados son los compuestos mayoritarios en la pulpa de la cereza (donde se encuentra el grano o semilla de café), en el grano, los compuestos fenólicos se encuentran representados predominantemente como esteres formados entre determinados ácidos hidroxycinámicos y ácido quínico, denominados de manera colectiva ácidos clorogénicos (Clifford, 1985). En la semilla también podemos hallar otros fenoles como taninos hidrolizables, lignanos y antocianinas, aunque todos en menores concentraciones que los anteriores.

Los ácidos clorogénicos que pueden alcanzar concentraciones cercanas al 14% en el café verde no sólo tienen una gran influencia en la calidad, aroma y sabor del café (Farah y col. 2006), sino que también tiene efectos beneficiosos sobre la salud, no solo por su poder antioxidante, también poseen actividad hipoglucémica, antiviral, hepatoprotectora (Basnet y col. 1996; Natella y col 2002; Higdon y Frei, 2006; Dorea y Costa 2005).

Los ACG son los principales componentes de la fracción fenólica del café verde (Trugo, 1984; Farah y Donangelo, 2006). Estos ácidos clorogénicos incluyen diferentes grupos de compuestos e isómeros formados por ácido quínico y de una a tres moléculas de un ácido transcínámico específico, como caféico, ferúlico o cumárico (Clifford, 2003). Sin embargo tan solo se han descrito pequeñas concentraciones de éstos ácidos transcínámicos no esterificados (Clifford, 1987).

La concentración y composición de los ácidos clorogénicos varía en función de la especie, grado de maduración de la semilla, prácticas agrícolas, incluso el tipo de suelo.

Pero estos fenoles no son los únicos presentes en el café verde; Clifford en 1985 ya describió la presencia de pequeñas concentraciones de compuestos fenólicos diferentes; como la existencia de al menos un 1% de compuestos fenólicos en forma de glicósidos. Mazza y Miniati en 1993 y Milder y col en

2005 estudiaron la presencia de antocianidinas, como pelargonidina, cianidina y lignanos; ó fenoles volátiles (Moreira y col 2000).

No se debería desechar la posible presencia de taninos, puesto que su existencia en la cereza (Clifford y Martinez-Ramirez, 1991), podría conducir a su migración a la semilla durante el procesado.

Una vez procesado, el café debe tostarse. Durante este proceso los ácidos clorogénicos van a sufrir una serie de reacciones de transformación dando lugar a otros fenoles que en gran medida van a participar en la generación del color (Montavón y col 2003), aroma e incluso sabor de la bebida final.

Debido a su inestabilidad térmica, durante el tostado, los ácidos clorogénicos son degradados casi en su totalidad. Parte de ellos sufren reacciones de isomerización , otros se transforman en quinolactonas y el resto se hidrolizan generando fenoles de bajo peso molecular (Clifford, 2000; Farah y col 2005). También pueden participar en reacciones de formación de melanoidinas (Montavón y col. 2003).

El tipo y condiciones de tostado influye de manera crítica en el contenido y composición de ácidos clorogénicos en el grano y en consecuencia en la bebida final (extracción acuosa del grano tostado molido adecuadamente). Unas condiciones demasiado fuertes pueden provocar pérdidas de hasta un 95% (Trugo 1984), sin embargo los niveles de fenoles volátiles aumentan durante el tostado (Moreira 2000), del mismo modo las lactonas aumentan durante el proceso alcanzando niveles máximos al alcanzar tostado medio (Farah y col 2005).

A consecuencia de todos estos cambios, la concentración y composición de compuestos fenólicos en el café bebida depende de muchas variables, y sin embargo, para aquellas personas que consumen café de manera habitual, esta bebida representa la mayor fuente de ácido clorogénico y cafeico en sus dietas.

Como se ha observado, los compuestos fenólicos mayoritarios en el café son los ácidos hidroxicinámicos y concretamente los denominados clorogénicos, que incluyen cafeico, ferúlico, cumárico , y el mismo clorogénico. Estos ácidos como el ácido ferúlico pueden aparecer unidos a las paredes celulares de las plantas (Risso y col 2007).

Diversos trabajos realizados en este laboratorio describen la presencia de compuestos fenólicos en las fracciones soluble e insoluble de la fibra de uva y otras frutas (Jiménez,- Escrig ,y col 2001; Saura-Calixto y Bravo 2001, así como a la FDS del vino (Díaz-Rubio y Saura Calixto 2007). Como continuación a esos estudios en este trabajo se ha investigado y cuantificado la presencia de los

compuestos fenólicos asociados y su capacidad antioxidante, convirtiéndose junto con la determinación y cuantificación de fibra, en otro objetivo de gran importancia en el trabajo que aquí se presenta.

II: MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MUESTRAS.

Para llevar a cabo este estudio, se analizaron diferentes tipos de café. Los criterios de elegibilidad empleados a la hora de decidir que tipos y variedades de café iban a ser objeto de estudio han sido fundamentalmente consumo y métodos de realizar infusión. De este modo se ha tenido en cuenta por una parte el tipo de café más consumido en España, el tueste (natural, torrefacto) tipo de infusión (expreso, filtro o eléctrico, soluble) y variedad (arabica o robusta).

El café descafeinado no se ha contemplado puesto que teóricamente, la ausencia o no de cafeína no debería influir en el contenido en FD (objeto principal de este trabajo), y su consumo en España aún no se considera mayoritario.

Finalmente las muestras elegidas han sido: **Café procedente de Colombia**, 100% Arabica, mezcla de 70% natural con de 30% torrefacto y **café liofilizado 100% puro Colombia**, ambos de Cafés La Mexicana Rodríguez y Mateus S.A. Madrid, España.

Las cantidades de café, el porcentaje de solubilización, así como infusión preparada se aprecian en la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de infusiones de café y porcentaje de solubilización

Tipo de Infusión	Café Empleado/infusión (g)	Infusion (ml) ^a	Solubilización (%) ^b	gr materia solubilizada/infusión
Expreso	6.82	40	22	1.50
Filtro	7.00	50	21	1.47
Instantáneo ó soluble	2.00	50	100	2.00

^a Taza de café obtenida

^b Porcentaje de solubilización se calculó con la siguiente expresión:

$$S(\%) = (C - RC) / C * 100.$$

S es solubilización; C es la cantidad de café empleada; y RC son los "posos"

2. REACTIVOS Y EQUIPOS ESPECÍFICOS.

- Se emplearon los reactivos y equipos descritos en el capítulo “materiales y métodos”
- Cafetera Solac professional coffee center
- Soxhlet System HTE de TECATOR. Höganäs. Suecia
- Bolsas de diálisis: membranas de celulosa con punto de corte para peso molecular 1000Da; 3500Da; 7000Da; Dialysis Tubing Visking, 9-32-36 mm (Medicell International, Ltd).

3. METODOS.

Para la determinación de la Fibra dietética en el café bebida ó infusión se ha empleado el método descrito en capítulos anteriores. La preparación de la infusión o bebida se han preparado más concentradas de lo habitual (aunque también depende del gusto del consumidor), para aumentar la concentración de FDS que se pensaba podía tener (Saura-Calixto y col. 2002; Díaz-Rubio y Saura-Calixto 2006).

3.1 Determinaciones y análisis especiales.

- En cuanto a la determinación de la fibra dietética en los posos y el café tostado molido y el café liofilizado, se llevó a cabo, en las muestras previamente desgrasadas y según el método publicado por Saura-Calixto y col., 2000, que determina fibra dietética como fracción indigerible

Brevemente, este método consiste en tomar 300mg de café molido y de posos (debidamente secados y desengrasados) e incubar durante 1 hora a 40°C con 0.2ml de una disolución de pepsina (300mg pepsina /ml de tampón HCl-KCl pH 1.5.). Transcurrido este periodo se añaden 9ml de tampón Tris-Maleato (0.1M, pH 6.9), seguidos de 5ml de α -amilasa (40mg/ml en tampón Tris-Maleato 0,1M, pH 6,9), y una posterior incubación de 16 horas a 37°C con 1ml de α -amilasa (120mg/ml tampón Tris-Maleato). Finalmente y tras separar los sobrenadantes de los residuos (fibra dietética insoluble) se tratan los sobrenadantes de las muestras con 0.2ml de amiloglucosidasa a pH 4.75, y se someten a una incubación de 45 min a 60°C.

Al terminar los tratamientos enzimáticos los sobrenadantes se transfieren a bolsas de diálisis y dializadas durante 48 horas a 25°C (flujo de agua de 7l/h).

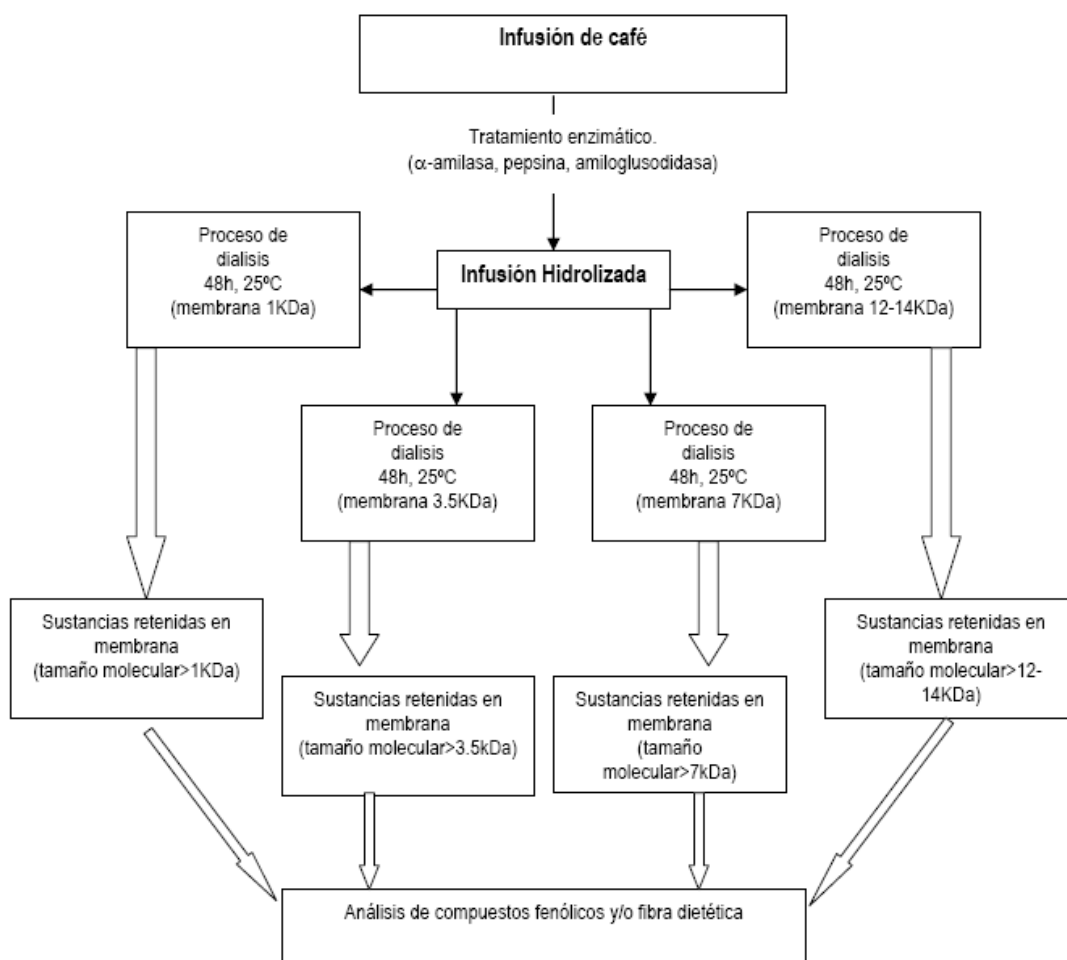
Transcurrido este tiempo, las disoluciones que permanecen retenidas en el interior de la bolsa de

diálisis se llevan a un volumen final de 100ml , y se hidrolizaron con ácido Sulfúrico 1M a 100°C durante 90 min. Determinándose la fibra dietética soluble espectrofotométricamente.

Los residuos una vez secos también sufren una hidrólisis con ácido sulfúrico. Tras dejarlos secar toda la noche, al día siguiente se tratan con ácido sulfúrico 12M durante 1 hora a 30°C, adicionando posteriormente agua , hasta alcanzar una concentración 1M; finalmente se realiza la hidrólisis a 100°C durante 90 min. Sobre este hidrolizado se determina la fibra dietética insoluble espectrofotométricamente, mientras que el residuo que permanece se conoce como lignina Klason.

- Determinaciones para elucidar la presencia de oligosacáridos en la fibra dietética soluble del café así como la posible influencia ó interacciones de las melanoidinas del café.

.Figura 3 Esquema del método empleado para elucidar la presencia de oligosacáridos en la fibra dietética soluble del café así como la posible influencia ó interacciones de las melanoidinas del café.



Este análisis consistió básicamente en un proceso de diálisis simultánea con las diferentes membranas. Tras los tratamientos enzimáticos habituales (pepsina, α-amilasa, amiloglucosidasa), la

muestra se dividió en fracciones cada una de la cuales se introdujo en una membrana de diferente tamaño de poro, la menor era de 1000Da, y la de mayor tamaño de 12000-14000Da (figura 3). Una vez finalizadas las diálisis, se tomaron muestras de cada una de ellas, y se realizaron diversos análisis

III. RESULTADOS y DISCUSIÓN.

1. FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE EN CAFÉ y CAFÉ COMO BEBIDA

El contenido en fibra dietética de las diferentes muestras analizadas se muestra en la tabla 4.

De los resultados obtenidos, se deduce que el café como bebida ó infusión contiene una cantidad apreciable de FDS (0.47-0.75g/100ml de bebida ó 2.54 -20.2 %s.s.).

El café como bebida ó infusión contiene una cantidad apreciable de FDS (0.47-0.75g/100ml de bebida ó 2.54 -20.2 %s.s.).(tabla 3).

Tabla 4. Fibra dietética del café

	Fibra dietética Soluble	Fibra dietética insoluble		Fibra dietética total
	(Az. N.+ Ac.U) ^d (%s.s. ^a)	(Az. N.+ Ac.U) (%s.s. ^a)	LK ^e (%s.s. ^a)	FDS+FDI (%s.s. ^a)
CAFÉ TOSTADO MOLIDO	5.48±0.01	38.18±0.08	27.7 ₆ ±0.7 ₆	71.426±0.8
INFUSION EXPRESO	3.08±0.02	ND ^f	ND	3.0813±0.0217
POSOS INFUSIÓN EXPRESO^b	2.52±0.006	39.8 ₁ ±0.3 ₆₁	34.3 ₅ ±2.1 ₆₀	76.31±2.11
INFUSION FILTRO	2.54±0.07	ND	ND	2.54±0.07
POSOS INFUSIÓN FILTRO^c	1.49±0.08	38.93±0.03	28.89±1.24	69.32±1.16
CAFÉ SOLUBLE MOLIDO	19.23±0.2 ₂	0.25±0.02	1.34±0.24	20.82±0.32
INFUSION CAFÉ SOLUBLE	20.2±0.9	ND	ND	20.2±0.9

^a Expresado como sustancia seca de café.

^b 1g de café tostado y molido=0.82 g posos café expreso.

^c 1g de café tostado y molido= 0.83g posos filtro

^d Azúcares Neutros (Az. N) + Ácidos urónicos (Ac. U)

^e Lignina Klason.

^f No detectado

El café instantáneo tiene más FDS (0.752g/100ml de café) que el café expreso o el café obtenido con cafetera de filtro (0.65-0.47 g/100ml de café); este hecho podría ser debido a la mayor extracción de materia soluble en el café liofilizado a partir del cual se prepara la bebida o infusión. Este café se obtiene a partir del café tostado obtenido a su vez del café crudo ó café verde; Una vez molido

(2-6mm) el café tostado se puede someter a dos tipos ó métodos de extracción, de los que la extracción mediante percoladores en batería es el más empleado en la actualidad. Con este método el agua de puede alcanzar una temperatura de hasta 200°C y el extracto abandona la célula a una temperatura que en muchas ocasiones roza los 80°C. Posteriormente el extracto se liofiliza y de este modo al preparar la infusión se solubiliza nuevamente. Si comparamos la cantidad de materia solubilizada con la concentración de fibra, se observa que el café instantáneo presenta una mayor concentración de fibra (en función de la materia solubilizada), siendo de un 38% s.s., mientras que en el café expreso (17% s.s.) y café de filtro (16%) son muy inferiores.

El origen, tostado y variedad del café también puede incidir en la concentración de FDS; Bradbury y Halliday (1990) describieron diferencias en la concentración total de polisacaridos para las variedades Robusta (38-48%) y Arabica(48-55%).

En cualquier caso la concentración de FDS en el café, es mayor que en otra bebidas de la dieta española (como se deduce de los siguientes capítulos).

De entre las otras infusiones, cabe destacar el hecho de que la FDS de la infusión de café expreso (3.08% s.s.) es mayor que la FDS de la infusión de la cafetera de filtro o eléctrica(2.54 % s.s.), esto puede deberse a las diferentes condiciones de extracción (presión y temperatura) utilizadas para obtener la bebida. La presión (P) y temperatura(T) empleadas por la cafetera expreso (sobre todo las de hostelería, como ha sido nuestro caso) son muy elevadas y, a mayor P y T, mayor es la proporción de compuestos que se van a extraer.

Podemos establecer una relación entre los datos de FDS de las infusiones con los datos de FD de los posos y del café tostado y molido. Teóricamente la FDT del café molido debería equivaler a la suma de la FDT de los posos (FDS+FDI, incluyendo LK en el valor de FDI) y FDS de la infusión.

Esta relación se cumple en todos los tipos de café excepto en el caso del café expreso, en cuyo caso la FDT del café molido(71.46%) es sensiblemente inferior a la suma de la FDT de los posos y la FDS de la infusión (79.03%) :

$$FDT < (FDS+FDI) \text{ de posos} + FDS \text{ infusión}$$

$$71.46 < (2,52+39,808+34,35) + 3,08$$

Una posible explicación a esta circunstancia seria debido al hecho del elevado valor de LK (lignina Klason) en los posos. Puede ocurrir que por las drásticas condiciones de presión y temperatura se generen compuestos de Maillard, que aunque en principio, y generalmente son solubles (Bekedam,

2006; Nunes y Coimbra, 2007), en estas circunstancias se unan, reaccionen o formen parte de la lignina Klason

La tabla 5 muestra los constituyentes monoméricos de la FDS de las infusiones de café. La galactosa(24-56.8mol%) y manosa (60-33.2mol%) son los constituyentes mayoritarios mientras que los minoritarios son ramnosa y glucosa (figura 4 y 5) . Este hecho sugiere que los galactomananos (GM) son los polisacáridos principales en la fibra dietética de cafe

El hecho de que los monosacáridos sean los componentes mayoritarios lo encontraremos en gran medida si hacemos un recorrido por los cambios que sufren los polisacáridos desde el grano verde a la infusión. El grano de café verde posee mayoritariamente en su estructura arabinogalactanos(AG), (galacto)mananos(GM), y celulosa, y en menor medida Ramnogalacturonano y xiloglucanos (Oosterveld y col, 2003, Navarini y col 1999) y presencia de acidos urónicos (principalmente galacturónico); pero durante el tostado se produce degradación de estos polisacáridos

Tabla 5 Constituyentes monoméricos de la FDS de las infusiones de café

	TIPO de CAFE		
	Expreso	Filtro	Soluble
FDS ^a (g/100ml café)	0.65 ± 0.03	0.47 ± 0.09	0.75 ± 0.04
FDS ^a (% s.s. de cafe)	3.08 ± 0.02	2.54 ± 0.07	20.20 ± 0.90
Composición de la FDS			
Acidos Urónicos (g/100ml cafe)	0.012 ± 0.004	0.0097 ± 0.0003	0.01825 ± 0.0004
Azúcares neutros (mol%)			
Glucosa	3.96 ± 0.04	3.88 ± 0.03	3.23 ± 0.09
Galactosa	24.1 ± 0.2	24.8 ± 1.3	56.8 ± 5.9
Manosa	60.9 ± 0.9	60.1 ± 2.9	33.2 ± 2.9
Xilosa	Nd ^b	nd	0.62 ± 0.04
Arabinosa	10.93 ± 0.2	11.1 ± 0.6	5.9 ± 0.5
Ramnosa	0.17 ± 0.02	0.227 ± 0.006	0.08 ± 0.01

^aFDS=Fibra dietética soluble.

^bno detectado

Aunque originariamente en café verde hay mayor cantidad de AG soluble en comparación con los GM; durante el tostado se rompen las paredes celulares que mantienen atrapados este polisacarido, de tal manera que no es que aumente su concentración, simplemente se vuelve mas accesible y soluble debido a este proceso. Sin embargo el efecto que produce el tostado sobre el AG se centra mas bien es la degradación y posterior reacción de Maillard de sus componentes, principalmte de la arabinosa. (Ooesterveld y col 2003).

Figura 4. Cromatograma de azúcares neutros de la FDs de café instantáneo

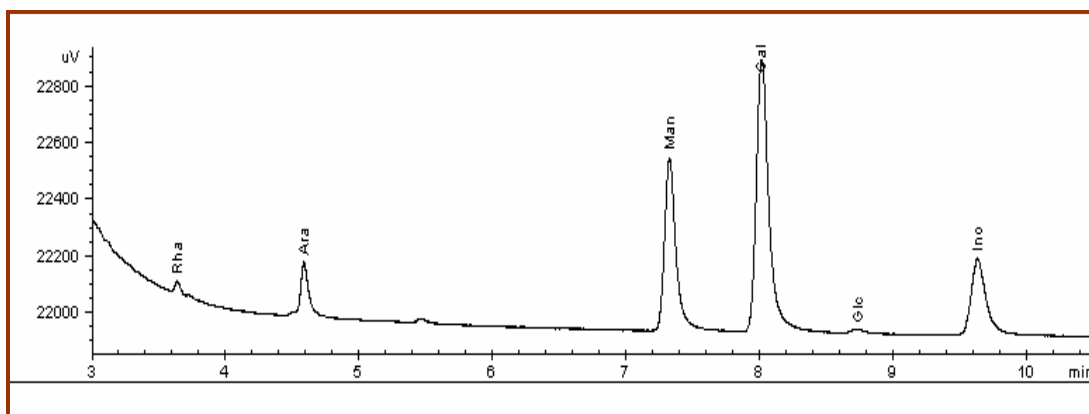
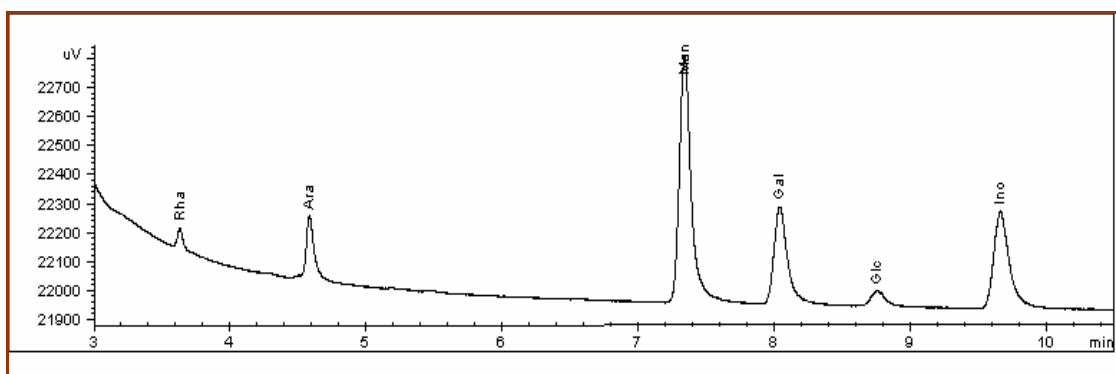


Figura 5. Cromatograma de azúcares neutros de la FDs café expreso



Aunque aparentemente en todas las infusiones o bebidas de café el galactomanano parece ser el polisacárido mayoritario, como se observa en la tabla y más claramente en la figura 3, las proporciones gal:man no son las mismas.

Como se ha descrito anteriormente, el galactomanano, puede tener sustituciones no solo de galactosa, sino en ocasiones pueden aparecer cadenas laterales de glucosa. Es de suponer que estas cadenas de glucosa puedan ocupar posiciones de sustitución en las que deberían encontrarse galactosas. Por lo que podría pensarse que a mayor glucosa, menor cantidad de galactosa en galctomanano.

Por otra parte también debe tenerse en cuenta el simple hecho de que la molécula de galactomanano en ocasiones tenga más cadenas laterales que otras. Esta característica depende de la variedad del café, así como del grado de maduración.

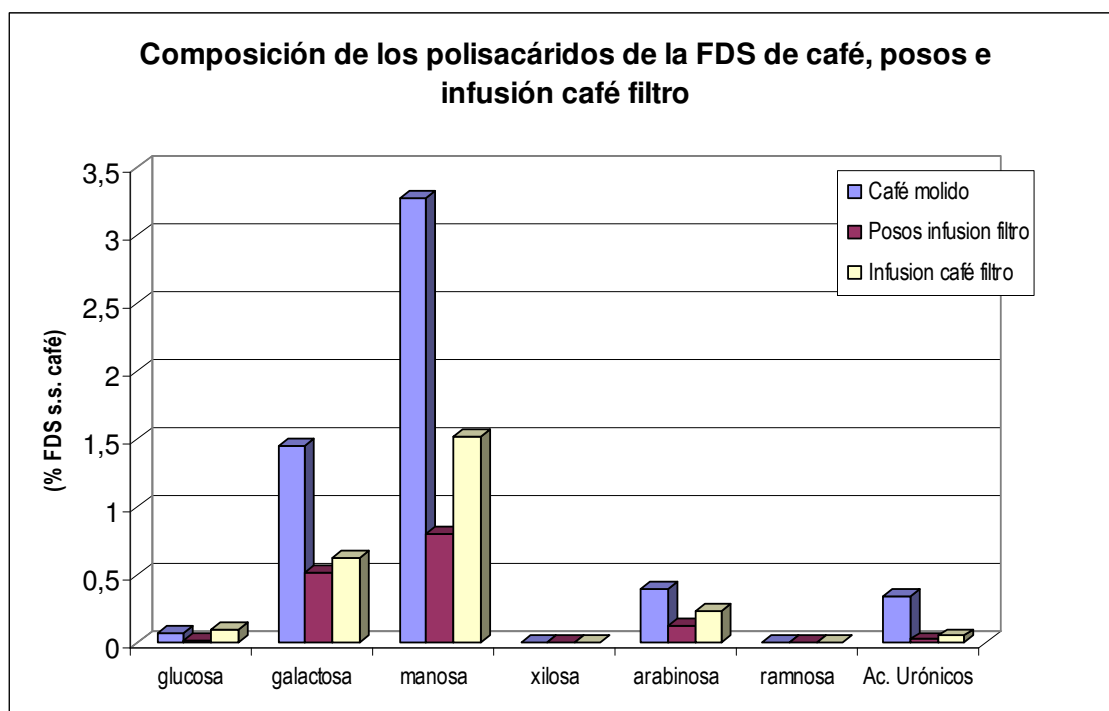
En cuanto a las pequeñas concentraciones de ácidos urónicos (0.012 –0.009 g/100ml), parece ser indicativo de que las pectinas de carácter ácido no son estructuras predominantes en la fibra dietética del café. De hecho, Redgwell y Fischer (2006), demostraron la existencia de ácidos urónicos enlazados a los arabinogalactanos (sustancias pécticas de carácter neutro) del café verde y café tostado.

Del mismo modo que sucedía con el valor total de la FD al compara el café con los posos y la infusión, en las siguiente grafica (figura 6) se puede apreciar la diferencia en la composición de los polisacáridos de la FDS del café de la cafetera de filtro.

De hecho se podría realizar el siguiente cálculo:

Monomero café molido \geq monómeroFDS + monómero FDS infusión.

Figura 6. Composición de los polisacáridos no digeribles del café, posos e infusión café filtro.



2. COMPUESTOS ASOCIADOS A LA FIBRA DIETETICA SOLUBLE DE LA INFUSIÓN DE CAFÉ . POLIFENOLES Y PROTEINA RESISTENTE

En la tabla 6 se muestra el contenido total de compuestos fenólicos (método Folin Ciocalteu) del café soluble o instantáneo y café de filtro, así como la concentración de los grupos fundamentales (cromatografía líquida de alta eficacia, "CLAE").

Tabla 6. Compuestos fenólicos en diferentes tipos de infusión de café

		Tipo de Infusion	
		Filtro	soluble
Metodo Folin-Ciocalteu	Fenoles totales(mg/L) ^a	2183 \pm 45	3613.2 \pm 42
CLAE (%)^{b,c}	Acidos Benzoicos	7.39 \pm 0.5	11.03 \pm 1.3
	Ac. Hidroxicinámicos ^e	74.28 \pm 3.4	52.95 \pm 3.4
	Flavonoides ^d	18.32 \pm 2.1	36.01 \pm 2.2

^a Fenoles totales expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de cafe

^b Fenoles determinados por CLAE (HPLC) agrupados en los 3 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por CLAE (HPLC).

^cCromatografía líquida de alta eficacia

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas.

^e Incluye ácido clorogenico

Estos resultados se correlacionan con los datos bibliográficos (Farah y col. 2006; Risso y col.2007,).

Del mismo modo se determinó la concentración de compuestos fenólicos (método Folin Ciocalteu) del expreso (1988.2 mg/L café) (tabla 7).

El café soluble ó instantáneo tiene una concentración mayor de fenoles extraíbles (316.3mg/100mL de café) ; este hecho al igual que sucedía con la concentración de FDS puede explicarse por diversas razones, la principal es a consecuencia del proceso de obtención del café liofilizado a partir del cual se prepara la bebida o infusión. Con este método el agua de puede alcanzar una temperatura de hasta 200°C y el extracto abandona la célula a una temperatura que en muchas ocasiones roza los 80°C. Posteriormente el extracto se liofiliza. Debido a estas drásticas condiciones de extracción (200°C), y su probable exposición al oxígeno atmosférico los ACG pueden autooxidarse y reaccionar formando complejos con melanoidinas (Montavon y col 2003), que dan positivo en el método Folin ; ó simplemente la formación de melanoidinas que pueden dar lugar a interferencias en este método y dar falsos positivos.

La extracción de compuestos fenólicos y concretamente de ácidos clorogénicos, depende de el tamaño de grano obtenido en molienda, la proporción del café frente a la cantidad de agua, el metodo de infusión (filtro, expreso o simplemente café soluble), la temperatura del agua y el tiempo que permanece el agua en contacto con el café. Generalmente las infusiones realizadas en el hogar, extraen mayoritariamente ácidos clorogénicos (Clifford 2000); dato que coincide con los resultados de CLAE mostrados en la tabla 6. En esta tabla se demuestra que empleando una cafetera de filtro se obtiene mayor proporción de ácidos clorogénicos que al elaborar una bebida de café soluble, que realmente es redissolver un extracto liofilizado obtenido industrialmente. Este liofilizado ha sufrido temperaturas de 200°C durante su extracción y mantener el extracto de café a elevadas temperaturas puede hacer que disminuya el contenido en ácidos clorogénicos y derivados (Schrader y col. 1996).

La diferencia entre los flavonoides determinados por HPLC en las diferentes infusiones, puede ser debido a que estos compuestos se encuentran mayoritariamente en la cereza, y solo en ciertas condiciones de extracción y procesado (quizá via húmeda) , como parece suceder en este caso con el café soluble, se solubilizan y pasan al grano. Huelga volver a comentar que también es consecuencia de la variedad de café.

Del mismo modo se determinaron posteriormente los compuestos fenólicos asociados, así como su capacidad antioxidante (tabla 7). Lo primero que observamos en la tabla 6, son los resultados de actividad antioxidante obtenidos en las infusiones. Si analizamos los datos obtenidos en las infusiones se observa que la capacidad antioxidante según el método FRAP es menor en el café de cafetera eléctrica (teniendo en cuenta la concentración de fenoles) frente a la infusión, pero no cuando se emplea el método ABTS⁺. Posiblemente las razones sean que durante la extracción en el método de la infusión de café de filtro, es más lento, no se realiza en condiciones de presión, por lo que la cafetera tiene entradas de aire, produciéndose un contacto más o menos prolongado con el oxígeno de la atmósfera pudiendo autooxidarse (Montavon y col 2003) y por ello su capacidad de actuar como reductor en método FRAP queda mermada.

Tabla 7. Compuestos fenólicos totales y asociados a la Fibra. Capacidad Antioxidante

			Tipo De Infusión		
			Expreso	Filtro	Soluble ó instantáneo
INFUSION de CAFE	Compuestos Fenólicos ^a		198.82±4.56	218.28±4.46	361.32±4.19
	Actividad antioxidante ^b	Método FRAP	19455±846	15652 ±446	25930±688
		Método ABTS*	8334 ± 433	12674 ± 484	12952 ±165
DISOLUCION De FDS^b	Compuestos Fenólicos ^a asociados		103.73 ± 1.12	87.56 ± 1.05	105.42±2.17
	Actividad antioxidante ^b	Método FRAP	5649 ± 129	4563 ± 68	6107± 113
		Método ABTS*	4932± 137	3137 ± 22	3869 ± 22

^a Compuestos fenólicos o fenoles expresados como mg/100ml café

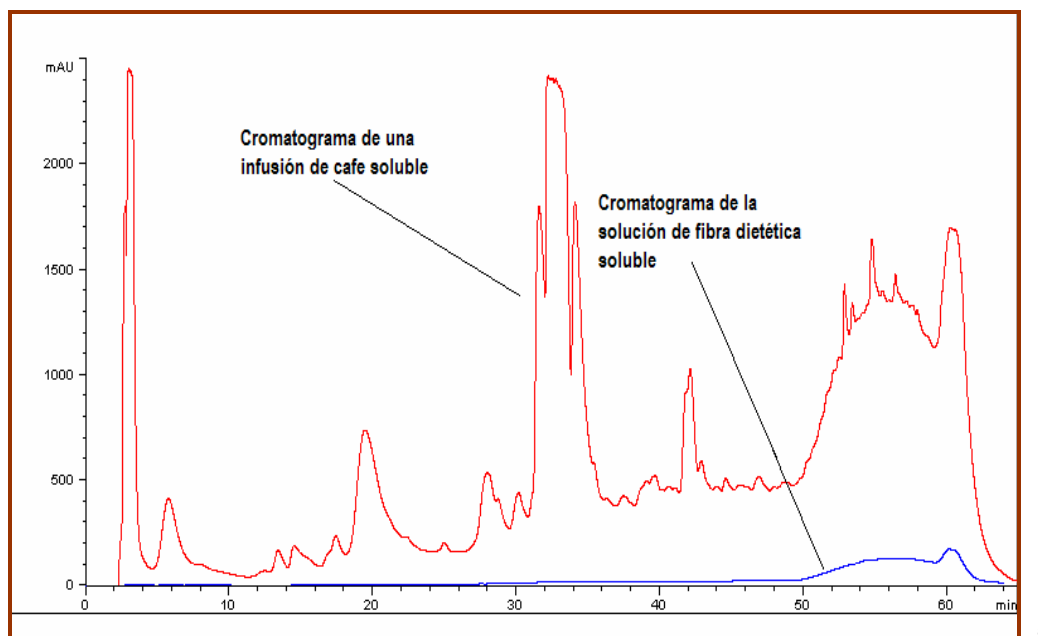
^b Actividad antioxidante expresada en µmol Trolox/L café

De la tabla 7, por otra parte, se deduce que existe una cantidad significativa de fenoles aparentemente asociados a la FDS (30-51% de los fenoles totales de la bebida). Es de esperar que estos compuestos fenólicos estén asociados a la fibra, si no lo estuvieran, debido a su pequeño tamaño molecular (como el ácido ferúlico con un tamaño de 194.12 Da) atravesarían la membrana de diálisis (12000 – 14000 Da) empleada en el método para simular la digestión.

Los compuestos fenólicos descritos en la literatura que se encuentran presentes en la infusión de café (Farah y col. 2006), se encuentran en forma libre ó bien como oligómeros de tamaño molecular menor de 12-14 KDa, por lo que es de esperar que sean dializados. En consecuencia podemos decir que entre 70-49% son fenoles que se encuentran libres, o bien unidos a melanoidinas de tamaño molecular inferior a 12kDa, o incluso proteínas que durante el proceso de simulación de la digestión han sido atacadas por la pepsina; mientras que entre 30-51% se encuentran unidos de alguna manera a la fibra. La concentración de fenoles asociados es mayor en el café soluble (105.42%), pero no el % de asociación (30%). Esto parece apoyar el hecho de la presencia de melanoidinas que dan falso positivo en la infusión de café pero que no permanecen retenidas en la membrana de diálisis.

Como se observa de la tabla 7 estos polifenoles asociados se pueden cuantificar espectrofotométricamente, pero cuando se utilizaron técnicas cromatográficas (CLAE), el cromatograma obtenido era plano (figura 7), ; sin embargo sabemos que existen no solo por los resultados de capacidad antioxidante que se correlacionaban con los fenoles determinados usando el método de Folin- Ciocalteau, si no tambien al realizar el espectro de absorbancia de la infusión y de la disolución de FDS (figura6)

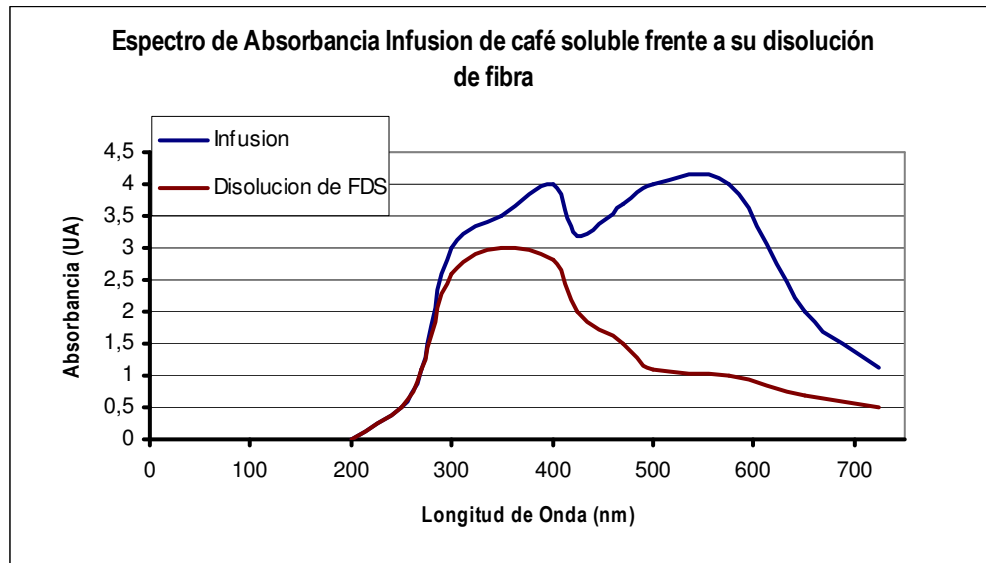
Figura 7. Cromatograma^{a,b} de una infusión de café soluble y de su respectiva soluciones de Fibra.



Se muestran solo la superposición de los cromatogramas realizados a $\lambda=280\text{nm}$, ya que con el método empleado es la longitud de onda a la cual absorben todos los compuestos fenólicos en mayor o menor medida.

^b En color rojo se aprecia el cromatograma de la bebida de café ($\lambda=280\text{nm}$), frente al cromatograma (color azul) que se obtiene a la misma longitud de onda cuando se analiza la solución de Fibra.

Figura 8. Espectro de absorción de infusión de café soluble y la correspondiente solución de fibra.



Otro dato que parece apoyar la presencia de los compuestos fenólicos asociados, es el hecho de que la FDS posea actividad antioxidante (tabla 7), incluso esta actividad antioxidante de la FDS se correlaciona con la concentración de compuestos fenólicos asociados. Existe correlacion entre fenoles asociados y actividad antioxidante según el método FRAP ($R=0.98$), aunque sin embargo la correlación según método ABTS* no es tan buena debido al bajo valor de actividad antioxidante de la infusión del café soluble ,con este método. Es posible que este valor se deba a que los compuestos fenólicos asociados no son los mismos cualitativamente hablando, existiendo muchos estudios que describen la diferente actividad antioxidante de los diversos compuestos fenólicos. (Madhava y col. 2008; Hanasaki y col. 2007; Rice- Evans y col. 1996)

En un intento por liberar los polifenoles unidos a la fibra y asi saber qué compuestos fenólicos estan asociados , se probaron diferentes tipos de hidrólisis .De todos los tratamientos, el único que mostró cierta efectividad fue una hidrólisis de tipo enzimático con celulasa (Ver capítulo metodología.).

Una de las características de las enzimas es su especificidad, y por tanto si quisiéramos saber realmente todos los polifenoles unidos y/o asociados (cantidad), asi como como cuales son con exactitud, sería necesario conocer todos y cada uno de los enlaces entre los compuestos fenólicos y los polisacárido, para de este modo emplear la enzima específica para cada enlace.

Debido a problemas de obtención adecuada de muestra, este tipo de hidrólisis solo se pudo realizar adecuadamente en el café soluble, y aunque debido a ello quizá no sea estadísticamente aceptable, si es suficientemene descriptivo de los compuestos fenolicos que se podrían encontrar

asociados a la FDS. Cuando se llevó a cabo la hidrólisis de la Fibra soluble con la enzima celulasa, se determinaron de nuevo los compuestos fenólicos así como capacidad antioxidante (tabla 8) y se observa que con este tratamiento enzimático se liberaron algunos de los polifenoles unidos a la fibra. Este hecho puede deberse a que la celulasa ha sido capaz de romper alguna de las uniones de los compuestos fenólicos con la fibra, lo cual a su vez nos podría dar una pista del tipo de uniones de los polifenoles con la fibra.

Tabla 8. Fenoles totales, asociados y liberados por hidrólisis enzimática.

	Compuestos Fenólicos ^{a,b}	Actividad Antioxidante	
		FRAP ^c	ABTS ^c
Infusión Café Soluble	3613 \pm 42	25930 \pm 688	12955 \pm 165
Solución de FDS^d	1054 \pm 22	6107 \pm 220	3869 \pm 220
Solución de FDS^e hidrolizada	1336 \pm 31	6217 \pm 24	4669 \pm 20

^a Fenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de café.

^b Capacidad antioxidante expresada en μ moles Trolox /Litro de café

^c Solución de Fibra dietética soluble. ^d Compuestos Fenólicos determinados por método Folin-Ciocalteu

^e FDS hidrolizada enzimáticamente con celulasa

En la tabla 8 se observa que los fenoles totales hidrolizados enzimáticamente son mayores que los asociados, es decir que realmente parece que se ha liberado algún fenol ó grupo de fenoles cuya unión con la FDS le impedía reaccionar con el reactivo Folin . También otro dato que podría avalar la verosimilitud de la liberación de compuestos fenolicos es la clara correlación que se observa entre estos compuestos y sus respectivas actividades anioxidantes en los diferentes estadios de infusión, FDS, FDS hidrolizada (en método FRAP R=0.99; y en métodos ABTS* R= 0.999).

Al llevar a cabo este tratamiento enzimático en la solución de fibra, pudo observarse algún compuesto por CLAE ,aunque debido a la complejidad de la muestra en principio tan solo se pudo identificar el grupo al que pertenecían los compuestos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos o flavonoides) (tabla 9).

En la tabla 9 se observa que la aparente liberación de ácidos clorogénicos es menor comparada con el resto de compuestos (flavonoides concretamente). Al desconocer exactamente el porcentaje original de cada compuesto unido a la fibra, no se puede decir con claridad si realmente es mayor la liberación de uno frente a otro. Este porcentaje de liberación por otro lado también depende de forma crítica de la especificidad de la enzima, que a su vez está en estrecha relación con el tipo de enlace que podamos encontrar.

Tabla 9. Compuestos fenólicos asociados a la fibra hidrolizados enzimáticamente ^a

Infusión de café soluble		
Método Folin-Ciocalteu	Fenoles totales asociados hidrolizados ^{a,b}	1336 _± 31
Método CLAE^c	Ácidos Benzoicos	6.93 _± 0.4
	Ac. Hidroxicinámicos	8.46 _± 1.1
	Flavonoides ^d	15.39 _± 0.8

^a Hidrólisis enzimática con celulasa

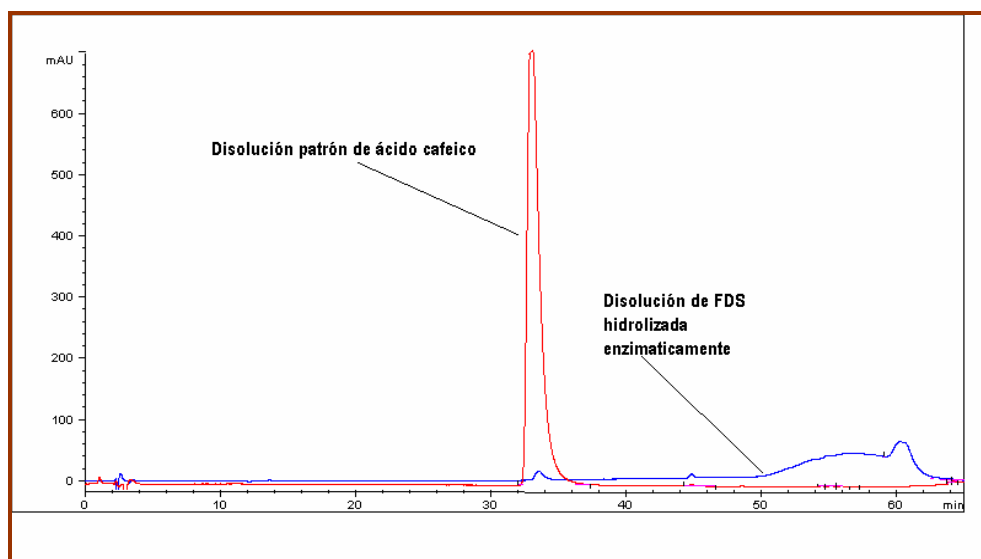
^b Expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de café.

^c Polifenoles determinados por CLAE agrupados en los 3 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por CLAE (cromatografía líquida de alta eficacia).

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas y antocianidinas.

En la bebida original los compuestos mayoritarios en los que se ven involucrados los ácidos clorogénicos, son ésteres entre ácidos transcinámicos y ácido quínico. Por lo que las uniones con pared celular quizá no sea mayoritaria. Por otra parte es posible que la unión de los flavonoides sea más débil o de otro tipo, más susceptible de degradación por la celulasa.

Figura 9. Cromatograma^{a,b} de FDS de café soluble hidrolizada frente a patrón de ácido cafeico



^a Se muestran solo la superposición de los cromatogramas realizados a $\lambda=280\text{nm}$, ya que con el método empleado es la longitud de onda a la cual absorben todos los compuestos fenólicos en mayor o menor medida

^b En color rojo se aprecia la disolución patrón de ácido cafeico (concentración 25ppm), mientras que en color azul se muestra la disolución de FDS de café soluble hidrolizada.

La celulasa libera algunos fenoles, de entre los cuales podemos observar en la figura 6 la liberación de un ácido hidroxicinámico. Si comparamos o superponemos (figura 9) los cromatogramas

entre la disolución de FDS hidrolizada con celulasa y una disolución patron de ácido caféico, parece que se podría confirmar no sólo la existencia compuestos fenólicos s asociados a la fibra, si no la mas que probable existencia de ácido cafeico como uno de ellos.

Para intentar demostrar la aparente inexistencia de oligosacáridos como integrantes de la FDS del café , pero fundamentalmente para discernir cuan escasa es la influencia de las melanoidinas del café en el “presunto “ complejo de FDS se llevaron a cabo análisis complementarios empleando membranas con diferentes tamaño de poro y por tanto . Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Azúcares, compuestos fenólicos y proteína según análisis complementario

	CAFÉ SOLUBLE (2g/50 ml Agua)		
	Azúcares Totales ^a g/L	Compuestos fenólicos ^b g/L	Proteína ^c (g/L)
Infusion	6.39 ± 0.15	3.16 ± 0.008	0.76 ± 0.006
Predialisis^d	9.51± 0.3	2.62 ± 0.04	1.07 ± 0.001
Membrana 1000Da	7.07 ± 0.06	1.02 ± 0.02	0.496 ± 0.005
Membrana 3500Da	7.54 ± 0.07	1.07 ± 0.01	0.532 ± 0.006
Membrana 7000Da	7.07 ± 0.03	1.03 ± 0.008	0.51 ± 0.004
Membrana 12000Da	7.78 ± 0.02	1.10 ± 0.002	0.52 ± 0.01

^a Azúcares totales determinados con método Dinitrosalicílico.

^b Fenoles determinados con método Folin-Ciocalteu.

^cProteína según método Bradford.

^d infusión con tratamientos enzimáticos propios del método (pepsina, amilasa, amiloglucosidasa)

Realmente si la infusión tuviera cantidades detectables de oligosacáridos no atacables por la enzimas, se necesitaria un método específico para detectarlos. Con el método desarrollado en nuestro laboratorio, debido al tamaño del poro de membrana empleado (12-14 kDa), estos oligosacáridos escaparían. Parece que las cantidades de oligosacáridos que se pueden detectar en la bebida o infusión de café es muy minoritario y carece de importancia nutricional (Toshio y Shigeyoshi 2006 a y 2006b).

Los resultados que se pueden deducir de la tabla 10, se ajustan a estas afirmaciones realizadas por Toshio y Shigeyoshi (2006b). Es de suponer que en la disolución denominada predialisis (Infusión que ha sufrido los tratamientos enzimáticos correspondientes previos al tratamiento de diálisis), se encuentren polisacáridos digeribles (no fibra) que han sido atacados por las enzimas(A), mientras que en la denominada predialisis hidrolizada (disolución anterior que ademas ha sufrido hidrólisis acida, para romper todos los polisacáridos), se encontraran los polisacáridos anteriores asi como los polisacáridos que forman parte de la fibra (B) y los posibles oligosacáridos que pudieran formar parte de la fibra (C).

Por tanto si realmente hubiese oligosacáridos cuantificables como fibra: $A + C < B$.

Sin embargo lo que sucede es $A + C \geq B$.

El hecho de que pueda ser algo mayor no es significativo, puesto que la diferencia es muy pequeña, y bien puede deberse a errores del método o manipulación, debido a que las muestras se someten a muchos tratamientos.

Tabla 11. Actividad Antioxidante de las diferentes “fracciones” según análisis complementario.

	CAFÉ SOLUBLE (2g/50 ml Agua)	
	Actividad Antioxidante	
	Metodo FRAP (mM Trolox) ^a	Metodo ABTS (mM Trolox) ^a
Infusion	27.9 ± 1.4	16.86 ± 0.06
Predialisis^d	23.1 ± 0.5	15.02 ± 0.09
Membrana 1000Da	6.69 ± 0.11	3.66 ± 0.03
Membrana 3500Da	6.73 ± 0.04	3.61 ± 0.03
Membrana 7000Da	5.02 ± 0.3	3.86 ± 0.01
Membrana 12000Da	6.05 ± 0.06	4.22 ± 0.04

^a milimoles Trolox/litro de infusión de café.

^b Hidrólisis con ácido sulfúrico concentrado 90 minutos a 100°C

^c no determinado. ^d infusión con tratamientos enzimáticos propios del método (pepsina, amilasa, amiloglucosidasa)

En la tabla 11 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de las diferentes “fracciones” según análisis complementario. De esta tabla al comparar la actividad antioxidante de la infusión con la predialisis se puede deducir que las enzimas apenas liberan compuestos fenólicos. En ambos casos las actividades antioxidantes son muy similares

Las melanoidinas son compuestos de estructura realmente compleja que se desarrollan durante el tostado del café. En el proceso de tostado se produce una degradación de los polisacáridos y proteínas, produciéndose la denominada reacción de Maillard entre los aminoácidos/proteínas y los azúcares reductores que han sido liberados. Las melanoidinas que se forman de esta manera, son solubles en agua (Bekedam y col, 2006) y pueden alcanzar el 25% s.s. de la infusión.

Debido a la compleja composición del café, se han descrito posibles reacciones o interacciones entre melanoidinas y algunos grupos fenólicos. ((Bekedam y col, 2006), sin embargo, Las melanoidinas destacan por su actividad antioxidante, pero si tuviéramos una importante cantidad de melanoidinas no atacadas por enzimas, o con tamaños moleculares mayores de las membranas empleadas, no existiría correlación entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante.

La composición, concentración y tamaño de melanoidinas depende del alimento, y de los procesos tecnológicos (como tostado a diferentes temperaturas) a los que se somete. Estudios de Borrelli y col (2003) mostraron que dependiendo del tostado del grano de café, el tamaño molecular de estas melanoidinas se situaban entre 1-4KDa (al aumentar el tostado aumenta el numero de melanoidinas pero disminuye el tamaño molecular). Del mismo modo al producirse este cambio estructural en las melanoidinas, se genera una disminución en su actividad antioxidante determinada por ABTS*. En este caso el tostado del cafe es grado medio, pero luego se somete a un proceso de extracción a temperaturas de 200°C, generando posiblemente una cantidad apreciable de melanoidinas, pero posiblemente de tamaño molecular inferior a 4KDa

En consecuencia, se podría insinuar que si a la actividad antioxidante de la membrana de 1000 (tabla 11) le restamos la capacidad antioxidante determinada en el retenido en la membrana de 3500 es posible que se obtuviera la actividad antioxidante de melanoidinas (los compuestos fenólicos son los mismos en ambos casos), pero sin embargo la capacidad antioxidante es la misma, al igual que los compuestos fenólicos. Por ello parece que las melanoidinas, apenas interfieren o se encuentran integradas en nuestro supuesto complejo de FDS. Pero este punto necesitaria de un estudio individualizado, que no se realizó durante el desarrollo de este trabajo puesto que no era uno de los objetivos de la tesis.

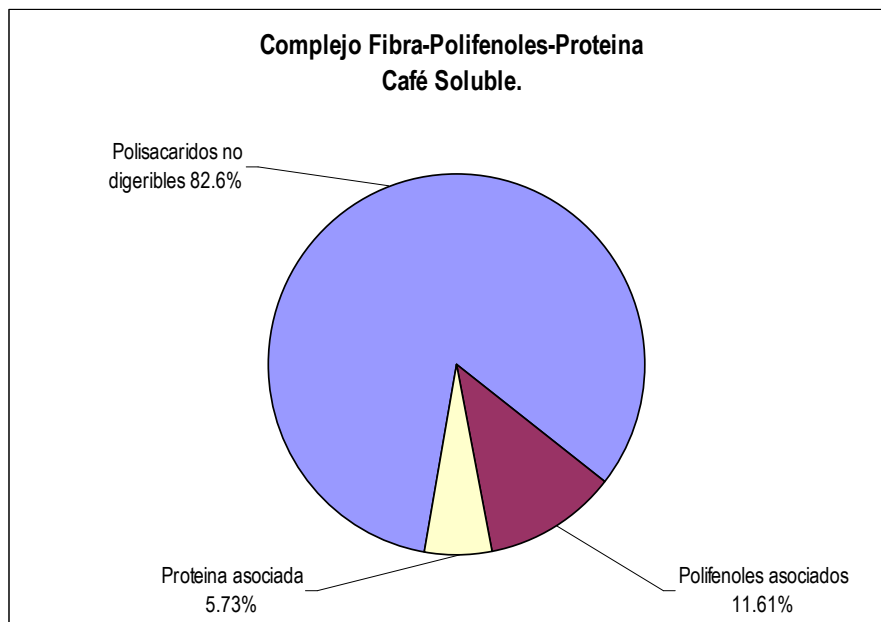
Algo que si era objetivo de la tesis era la posibilidad de la existencia de **proteína** no digerible, formando parte de lo que podría llamarse complejo de FDS.

De la tabla 11 se deduce que al comparar el contenido proteico retenido por las diferentes membranas no presentas diferencias significativas. Aproximadamente el 68% de la proteína del café soluble es proteína no digerible , es decir, no sufrieron degradación por las enzimas empleadas en el método de análisis (que por otra parte simula el proceso de digestión),y que según la última definición aceptada (De Vries 2004) van forman parte de la fibra dietética. Esta proteína podría ser simplemente proteína no digerible, o estar unida a la fibra por enlace ester a través de los AGP, por polimerización con ACG que a su vez formen parte del complejo FDS.

En definitiva parece que podemos hablar de la existencia de un complejo de Fibra Dietética (Fibra dietética soluble- polifenoles- proteína) en el café infusión (Ver Anexo I con fotos realizadas mediante microscopia electrónica de barrido y Anexo 2 con fotos del complejo de FDS liofilizado), cuyas concentraciones son cercanas a los 9.4g/L .

Este complejo posee entre 30-51% de los polifenoles totales de la infusión de café bebida y aproximadamente 68% de la proteína, (figura 10). Es decir que del total de compuestos fenólicos que posee el café el 70-49% cabe suponer que sean debidamente absorbidos y metabolizados.

Figura 10. Complejo de fibra dietética-polifenoles-proteína.



Sin embargo aún es necesaria una mayor investigación para conocer con total exactitud qué polifenoles son absorbidos y cuales permanecen asociados a la fibra, así como un estudio específico centrado en la presencia de melanoidinas .

En resumen.

La fibra dietética es un constituyente cuantitativamente importante en el café. El café expreso presenta concentraciones de 4.5 g/L de bebida , mientras que la infusión de café soluble o instantáneo alcanza los 7.5 g/L. Los galactomananos , seguidos de Arabinogalactanos (sustancias pécticas) son los principales constituyentes de la fibra dietética soluble del café.

Los posos del café tienen cantidades significativas de fibra dietética y antioxidantes asociados

La fibra dietética en el café aparece como un complejo formado mayoritariamente por polisacáridos no digeribles, seguido junto polifenoles asociados y proteína no digerible. El 30-51% de los compuestos fenólicos del café y entre el 70%-49% de la proteína llegan intactos al colon.

Los ensayos preliminares mostraron que las mealonoidinas apenas interfieren de manera asilada, sus posibles efectos podrían derivarse de posibles interacciones con el complejo de fibra.

Con la nueva legislación de la Unión Europea (Reglamento (CE) nº 1924/2006) sobre alegaciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos, las infusiones de café podrían definirse como alimentos con “alto contenido en fibra” o “ricos en fibra” debido a que poseen 10-16g de FDS /100Kcal

OTRAS BEBIDAS

I. ANTECEDENTES. DEFINICIONES, ELABORACIÓN Y COMPOSICIÓN

El propósito principal de este capítulo es la aplicación de manera sistemática del método específico de determinación de fibra dietética soluble (y posteriormente los compuestos asociados) a otras bebidas de consumo habitual en la dieta española, para cuantificar dicha FDS, así como la composición complejo de fibra dietética soluble (que incluye polisacáridos no digerible, fenoles asociados, proteína asociada ó no digerible).

Además del vino, el café y la cerveza, otras bebidas de consumo muy extendido en el país son: sidra, zumos (“caseros” ó comerciales) ó néctares de frutas, infusiones (té, manzanilla), bebidas de cacao, así como la horchata y diversos tipos de refrescos (coca cola, trinaranjus) (MAPA 2005).

Atendiendo a las diferentes reglamentaciones técnico sanitarias, podemos definir:

Zumo de frutas (Real decreto 1050/2003 de 1 de Agosto) como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. (Zumo “casero”).

Zumo de frutas a base de concentrado designa el producto obtenido mediante la incorporación al zumo de frutas concentrado de la cantidad de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y la restitución de los aromas, y en su caso, la pulpa y celdillas perdidas del zumo, pero recuperados en el proceso de producción del zumo de frutas de que se trate o de zumos de frutas de la misma especie(Real decreto 1050/2003 de 1 de Agosto).

Se entiende por **zum de frutas concentrado** al producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies, por eliminación física de una parte determinada del agua.

Néctar de frutas. es el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel a los productos definidos anteriormente, al puré de frutas o a una mezcla de estos productos. La adición de azúcares y/o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20 por cien del peso total del producto acabado.

En el caso de la elaboración de **néctares de frutas sin azúcares añadidos (como los analizados para este estudio)** o de valor energético reducido, los azúcares podrán sustituirse total o parcialmente por edulcorantes conforme al Real Decreto 2002/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos edulcorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización.

El real decreto 3176/1983, de 16 de noviembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de especies vegetales para infusiones de uso en alimentación, define **infusión** como el producto líquido obtenido por la acción del agua, a temperatura de ebullición, sobre la especie vegetal, con el objeto de extraer las sustancias solubles de la misma. Entre las especies vegetales para infusiones de uso en alimentación, contempladas en esta reglamentación encontramos: Manzanilla.- Matricaria chamomilla; Manzanilla amarga.- Anthemis nobilis; Manzanilla de Mahón.- Santolina chamaesiperys; Menta.- Mentha piperita; Menta poleo.- Menta pulegium.

El Real Decreto 1354/1983, de 27 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de té y derivados, define el Té como las hojas jóvenes y las yemas, sanas y limpias, de las distintas especies del género botánico *Thea*, en buen estado de conservación, convenientemente preparadas para el consumo humano, y poseyendo el aroma y gusto característicos de su variedad y zona de producción. A efectos de esta reglamentación se distinguen diferentes clases de te, como el te negro ó te (el té convenientemente elaborado por fermentación, aunque conservando sus mismos principios activos (el empleado en nuestra infusión comercial)), y se define extracto soluble de té como el producto soluble en agua, obtenido por parcial o total evaporación de la infusión de té.

En el caso de la bebida de cacao, la reglamentación tecnico sanitaria correspondiente (Real Decreto 1055/2003, de 1 de agosto) define **cacao en polvo ó cacao** como el producto obtenido por la transformación en polvo de granos de cacao limpios, descascarillados y tostados y que contenga un 20 por ciento, como mínimo, de manteca de cacao, calculado sobre el peso de la materia seca, y, como máximo, un 9 por ciento de agua; por otra parte, **cacao magro en polvo, cacao magro, cacao desgrasado en polvo, cacao desgrasado** es cacao en polvo que contenga menos del 20 por ciento de manteca de cacao calculado sobre materia seca. En consecuencia **el cola cao** preparado podría definirse como bebida láctea al cacao (cacao desgrasado).

En el Real decreto 15/1992, de 17 de enero, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de bebidas refrescantes, se definen **las bebidas refrescantes**, como aquellas bebidas preparadas con agua potable y los ingredientes y demás productos autorizados por esta reglamentación, adicionada o no de anhídrido carbonico. las distintas clases de bebidas refrescantes en base a su composición tendrán diferentes denominaciones, entre las que cabe destacar: agua carbonatada, **bebidas refrescantes de zumos de frutas**(bebidas elaboradas con agua potable, gasificada o no con anhídrido carbónico, zumo de frutas, azúcares, agentes aromáticos naturales y aditivos autorizados), ó **bebidas refrescantes aromatizadas**. bebidas coloreadas, turbias o no, preparadas con agua potable, anhídrido carbonico opcional, azúcares y/o edulcorantes artificiales, agentes aromaticos y otros aditivos autorizados, pudiendo contener, además, zumos de frutas y/o

derivados lácteos. Teniendo en cuenta lo siguiente: a) las bebidas carbonatadas contendrán, como mínimo, dos gramos por litro de anhídrido carbónico; b) las bebidas a base de cola (**coca cola**) podrán contener cafeína en cantidad máxima de 150 miligramos por litro; c) las bebidas denominadas **aguas tónicas** y los amargos no vinicos podrán contener quinina en cantidad máxima de 100 miligramos por litro

La Orden de 1 de agosto de 1979 por la que se reglamentan las sidras y otras bebidas derivadas de la manzana, define en su artículo 4: **sidra natural** es la sidra elaborada siguiendo las prácticas tradicionales, sin adición de azúcares, que contiene gas carbónico de origen endógeno exclusivamente. Su graduación alcohólica adquirida será superior a 4,5 grados.

Denominamos **horchata de chufa** (Real Decreto 1338/1988 de 28 de Octubre) al producto nutritivo de aspecto lechoso, obtenido mecánicamente a partir de los tubérculos *Cyperus sculentus* L., sanos, maduros, seleccionados y limpios, rehidratados, molidos y extraídos con agua potable, con o sin adición de azúcar, azúcares, o sus mezclas, con color, aroma y sabor típicos del tubérculo del que proceden, con un contenido mínimo de almidón, grasa y azúcares, según se especifica para cada tipo de horchata de chufa en la reglamentación técnico-sanitaria. Su conservación se conseguirá únicamente por tratamientos físicos autorizados, para cada clase y tipo de horchata,

II. PROCESOS GENERALES DE ELABORACIÓN y COMPOSICIÓN.

Como se ha comentado en capítulos anteriores, es muy importante tener unos conocimientos básicos del proceso de elaboración de la bebida, zumo ó infusión para conocer la influencia sobre la composición del producto final (cantidad de fibra) de los tratamientos llevados a cabo durante el proceso.

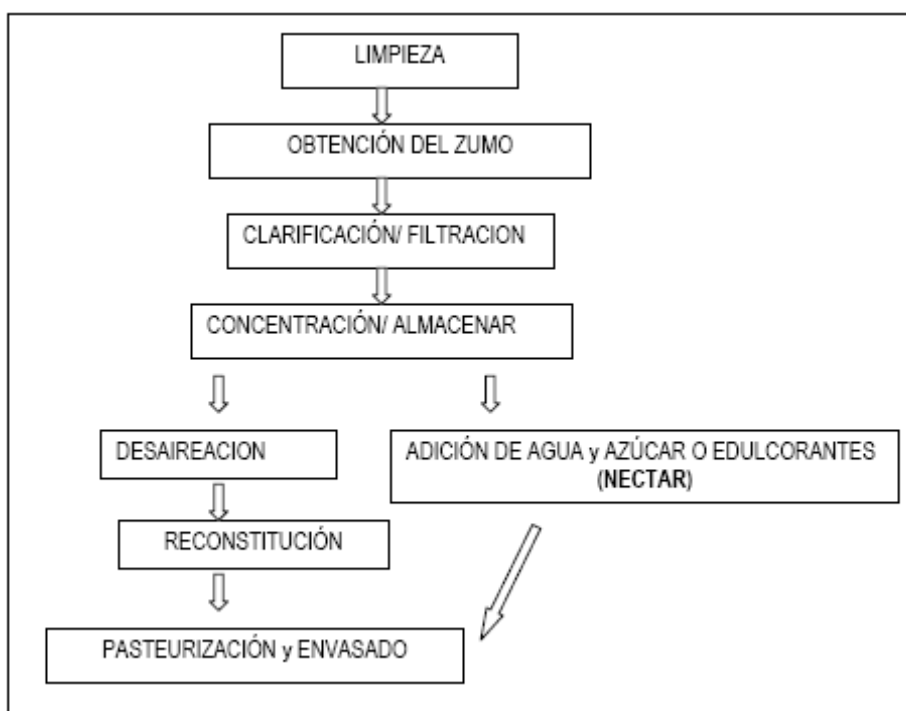
ELABORACIÓN DE ZUMO ó NECTAR DE FRUTAS. COMPOSICIÓN

En general los zumos de frutas se obtienen a partir de frutas frescas por presión mecánica o a partir de concentrados de frutas.

La elaboración de los zumos de frutas comprende las siguientes fases: preparación de la fruta, obtención del zumo, tratamiento del zumo y procesos de conservación. Para la obtención del zumo se utilizan prensas, así como otros procedimientos como filtración a vacío o extracción en caliente (Belitz y col. 2004). Una vez obtenido el zumo y tras los debidos tratamientos de clarificación, se procede al proceso de conservación. Estos procesos pueden ser muy variados como la concentración. El zumo concentrado se emplea como materia prima para la elaboración del néctar (figura 1).

Las diferentes tecnologías empleadas a la hora de elaborar los zumos dependen del tipo de fruta (manzana, piña, uva) o de la hortaliza (tomate). Estos procesos y tecnologías van a afectar a la composición cualitativa y cuantitativa del zumo ó producto final, que en primera instancia va a depender del tipo de fruta, es decir, la composición química general de un zumo depende del tipo de hortaliza o fruta con la que esté elaborado y de la madurez de esta materia prima (Belitz y col. 2004). Los zumos de frutas son una buena fuente de vitaminas y minerales, y contienen los mismos nutrientes de las frutas de partida a excepción de la fibra.

Figura 1. Esquema general de elaboración de zumos y néctar.



Los compuestos nitrogenados constituyen el 0.1-1.5% de la fruta, de los que entre 35-75% son proteínas libres. La mayor parte de la fracción proteica está constituida por enzimas (enzimas pectinolíticas, proteinasas como bromelina, lipasas, polifenoloxidasas)(Janovitz-Klapp y col. 2007; Correa-García y Buzaleh, 2007). La fracción soluble de compuestos nitrogenados tiene un 50% de aminoácidos libres (el tipo de aminoácido es característico de cada especie de fruta).

Dentro del grupo de los hidratos de carbono podemos distinguir glucosa y fructosa como los principales monosacáridos (otros como arabinosa y ramnosa se encuentran en trazas). Entre los oligosacáridos destaca la sacarosa como disacárido predominante, aunque existen algunas frutas como uva, cereza o higo que carecen de ella. También cabe destacar la importante cantidad de mesoinositol (azúcar-alcohol) que se encuentra en la piña y cítricos (sanz y col. 2004).

Por otra parte en lo que a polisacáridos se refiere, todas las frutas poseen celulosa, hemicelulosa, pentosanos y pectinas (Pagán y col. 2001; Hedges y Maness, 1996; Kurz y col. 2008). **Los polisacáridos no digeribles** forman parte de la fibra y de esa fibra solo la fracción soluble aparecerá en el zumo. En esta fracción soluble destacan las sustancias pécticas que por otro lado son los polisacáridos que más cambios sufren durante la maduración (las pectinas solubles aumentan durante la maduración del fruto) y el procesado para la obtención del zumo

La fracción lipídica (carotenoides, triterpenoides y ceras) es minoritaria (0,1-0,5% en peso). Solo alcanza valores mayores en el caso del tomate, debido a la presencia de licopeno (Gómez-Romero y col. 2007).

La relación de ácidos orgánicos citrio/isocítrico sirve en zumos como indicador de disolución acuosa. Otros ácidos orgánicos son: málico, y tartárico (aunque éste último sólo en la uva).

Los compuestos fenólicos son extremadamente importantes en las frutas y en consecuencia en los productos derivados de ella como los zumos y néctares. Estos compuestos contribuyen no solo a las propiedades organolépticas de sabor y color, sino también ejercen cierto efecto protector de oxidación sobre la propia fruta y aunque en menor medida sobre productos derivados. El procesado de la fruta da lugar a ciertos cambios en el color debido al efecto de esta tecnología sobre los fenoles (Bengoechea y col. 1997).

Los principales ácidos son los hidroxicinámicos como p-cumárico, ferulico, cafeico, sinapico (todos en forma de ésteres con ácido quínico y glucosa, aunque en ocasiones con meso-inositol), aunque también encontramos ácidos hidroxibenzoicos, de los que los más importantes (también en forma de ésteres) son: gálico, protocatequico, gálico, vainillínico, elágeno. Durante la maduración del fruto puede ocurrir que los ácidos hidroxicinámicos sufran una reacción de oxidación y se transformen en ácidos hidroxibenzoicos (Burda y col. 1990, Andreotti y col. 2006; Brandelli y col. 2005)).

Otro grupo de compuestos fenólicos muy abundante en las frutas y en zumos son los flavan-3-oles y sus formas polimerizadas (proantocianidinas y taninos condensados) (Mullen y col. 2007, Belajová y Suhaj, 2004). Las proantocianidinas son solubles hasta un tamaño molecular de 7000 (corresponde a 20 unidades de flavonoides). Estas formas poliméricas (principalmente taninos) pueden unirse a sustancias proteicas en los zumos y generar turbios (como en la cerveza), que entorpecen el proceso de elaboración y pueden afectar al producto final (Le Bourvellec y col. 2007).

El procesado al que se somete la fruta (para obtener el zumo, néctar) produce grandes cambios de pH, contaminación con metales, adición de conservantes (ácido ascórbico) y otras sustancias que inciden de

manera crítica en el color de las antocianinas, es decir en la forma en que se encuentran y en consecuencia en sus propiedades. En presencia de metales puede formar complejos con ellos, por reacción con ácido ascórbico forman flobafenos., por asociación intermolecular se genera el fenómeno de copigmentación.

Los compuestos fenólicos mayoritarios en la naranja son las flavanonas (Ribeiro y col 2008) como naringenina o hesperidina. Estos fenoles influyen en el sabor; la eliminación del sabor amargo en los zumos se puede lograr por degradación del resto azúcar con enzimas. Ciertos glicósidos flavónicos amargos se pueden transformar en chalconas o dihidrochalconas (sabor dulce) como la neohesperidina DC, empleada como edulcorante artificial no calórico en los néctares analizados en este trabajo. Chalconas y flavonoles (quercetina , miricetina) son muy importantes en frutas como manzana y melocotón, encontrándose siempre en forma de glicósidos.

Al calentar la fruta (como sucede durante el proceso industrial de elaboración del zumo), se liberan compuestos aromáticos. En cítricos el aroma se debe a la presencia de terpenos.

Son especialmente ricos en vitamina C, sobre todo en el caso de los zumos de cítricos. No obstante, el contenido en dicha vitamina se pierde en gran medida durante los procesos de elaboración industrial así como por efecto de la temperatura o tiempo de almacenamiento.

En el zumo de manzana, se ha encontrado una reducción en los niveles de algunos fitonutrientes (Kahles y col. 2005; Adil y col.2007) de hasta un 50%, como es el caso del ácido clorogénico; o de un 3% aproximadamente en el caso de las catequinas.. A pesar de que el contenido en determinados compuestos es menor en el zumo que en la fruta completa, el zumo de manzana todavía presenta en su composición ciertas sustancias con actividad antioxidante, por lo que tal y como han indicado algunos estudios su consumo podría ser capaz de reducir la peroxidación lipídica.

En lo que se refiere al zumo de naranja, es preciso recordar que éste apenas contiene fibra y tiene menores cantidades vitaminas y minerales que la naranja entera. En cualquier caso, lo ideal es tomarlo recién exprimido, para evitar pérdidas de vitamina C. En todo caso, al igual que en otras frutas, es mejor el zumo natural sin procesar que el envasado industrialmente, ya que el proceso al que éste último se somete tiene un mayor impacto sobre la bioactividad de los fitonutrientes.

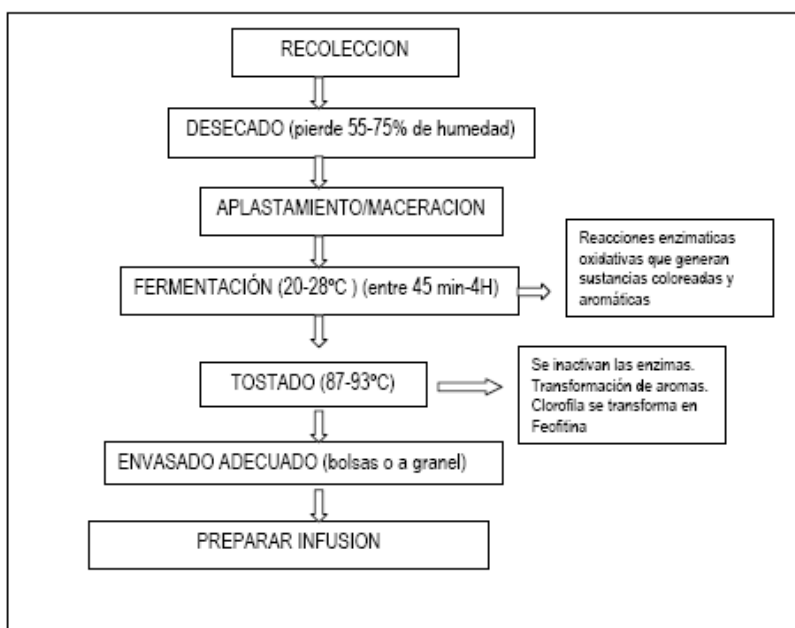
ELABORACIÓN y COMPOSICION DE INFUSIONES (te, manzanilla, poleo).

Para entender la composición de la infusión es necesario conocer de manera general el proceso de obtención (figura 2) del te,(manzanilla, poleo) con el que se prepara la infusión objeto del estudio. La

composición química tanto del te como del poleo o manzanilla, varía dentro de amplios márgenes, de acuerdo a origen, edad de la planta, tratamiento (McKay y Blumberg 2006 a y 2006 b).

Existen diferentes tipos de te, pero la mayor parte de las cosechas de se te elaboran en forma de te negro. Las clases comerciales de te vienen determinadas por el origen, condiciones climáticas, edad tipo de tratamiento y clasificación de las hojas. De todas ellas la mas importante para nosotros es Te Fannings (y además negro), constituido por hojas rotas y pelusa, casi exento de tallos y pedúnculos. Es el empleado mayoritariamente en la industria de te en bolsitas para infusión.

Figura 2. Proceso de obtención de te (poleo, manzanilla)



Se han identificado más de 120 constituyentes en la flor de **manzanilla** (McKay y Blumberg, 2006 a). Aminoácidos, polisacáridos, ácidos grasos están presentes en el mucílago, en una concentración que representa el 10% de la flor. El contenido en minerales depende del tipo de cultivo. Cultivos salvajes poseen una relación K/Na y Ca/Mg mucho mayores. En las infusiones de esta flor se encuentra el 10-26% de los minerales, siendo K, Ca y Mg los mayoritarios (McKay y Blumberg, 2006 a). Del mismo modo incluye entre 0.4-2% de aceites esenciales (terpenoides, azulenos). Las infusiones tienen 10-15% del aceite esencial de la flor.

En cuanto a los fenoles; apigenina, quercetina, patuletina, luteolina y sus glicósidos son los mayoritarios en el total de la flor. Mulinacci y col (2000), por otra parte, describieron la presencia de elevadas concentraciones de ácidos cafeico y ferúlico. Los compuestos fenólicos aquí descritos son solubles en agua caliente (infusión) y su concentración se debe tener en cuenta.

Los principales componentes **del poleo** son ácidos grasos (palmitito, linoleico, linolénico), así como compuestos volátiles. En la infusión encontramos 8-60% de la cantidad de sustancias minerales presente en las hojas: calcio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, cromo, yodo y selenio, mientras que los compuestos fenólicos constituyen el 19-23 % de las hojas (flavonoides son 12%), de los que el 75% se extraen en la infusión (McKay y Blumberg, 2006 b).

El proceso de **obtención de la infusión de te** comienza en el momento en que se recolectan las hojas. Durante este proceso, todos los compuestos descritos en la tabla 1 van a sufrir diversas transformaciones (Balentine, 1992).

El 25-35% del extracto seco de las hojas de te son compuestos fenólicos, correspondiendo el 80% de ellos a flavonoles, que se oxidarán enzimáticamente durante la fermentación (dando lugar al color rojo-negro característico del te negro). Sin embargo en el te verde se inactivan estas enzimas para evitar la oxidación; por ello la principal diferencia entre te negro y te verde radica en la composición fenólica. Las reacciones de oxidación ocurridas durante fermentación dan lugar a reacciones o “combinaciones” de flavonoles, generando aparición de teaflavinas, o tearubiginas (Owuor y McDowell, 2007). Estas últimas son compuestos poliméricos que proporcionan color al te negro, su estructura básica está constituida por productos derivados de la oxidación de la catequina que a su vez pueden reaccionar con proteínas, polisacáridos, otros derivados fenólicos. También se ha postulado su aparición por oxidación de teaflavina. Tearubiginas constituyen el 30-60% de los sólidos solubles del te negro (Graham, 2007; Yuengang y col. 2002). La cafeína (2.5-5.5% del extracto seco) es de gran importancia en el sabor del te. En cantidades inferiores encontramos teobromina y teofilina.

La fracción proteica del te está constituida principalmente por enzimas (Es de gran importancia la polifenoloxidasas); mientras que los aminoácidos libres constituyen el 1% del extracto seco de las hojas del te (el 50% de ellos corresponden a tenina) (Graham, 2007).

Como polisacáridos existen celulosa, hemicelulosas y sustancias pecticas. De éstos, los no digeribles y solubles podrán cuantificarse como fibra soluble.

Tabla1. Composición del te y su infusión

COMPONENTE (%)	TE FRESCO	TE	INFUSIÓN
Fenoles	30	5	4.5
Proteínas	15	15	Trazas
Aminoácidos	4	4	3,5
Cafeína	4	4	3.2
Fibra bruta	26	26	0
Otros Carbohidratos	7	7	4
Lípidos	7	7	Trazas
Pigmentos	2	2	Trazas
Volátiles	0,1	0.1	0,1
Minerales	5	5	4,5

Fuente: Belitz y Groszch, 2004

Los principales pigmentos en el te son clorofila y carotenoides. La clorofila se degrada durante fermentación (feoforbidos, feofitinas). De los carotenoides identificados en las hojas de te, los principales son xantofila, neoxantina, violaxantina, β -caroteno, que también se degradan durante elaboración de te negro (Dimitrios, 2006; Ravichandran y Ramaswamy, 2002).

Los compuestos aromáticos constituyen alrededor del 0.01-0.02% del extracto seco del te. El te negro proporciona 4-5 veces más concentrado aromático que el te verde, mientras que el elemento mineral más importante en el te es el potasio, constituyendo el 50 % del total de minerales (5%).

OBTENCIÓN DE CACAO, y COMPOSICIÓN. ELABORACIÓN DE COLACAO

A diferencia del café y del té, el cacao es un caso particular en cuanto a la forma en que se consume; generalmente se consume como sólido o en forma de bebidas o preparados lácteos.

Para conocer la composición de la bebida láctea de cacao, es importante tener claros los principios de la obtención de cacao en polvo, y de este modo entender las transformaciones que sufriran sus compuestos desde que se recolecta el grano hasta que la industria elabora el producto final (cacao, Nesquik). En la composición de un preparado lácteo de cacao (como el analizado en este estudio), encontraremos componentes propios del cacao y de la leche.

La composición del cacao sufre diversas transformaciones desde que se recolecta el grano hasta que se obtiene el cacao en polvo. La composición general del cacao (Belitz y Grosch, 2004) incluye:

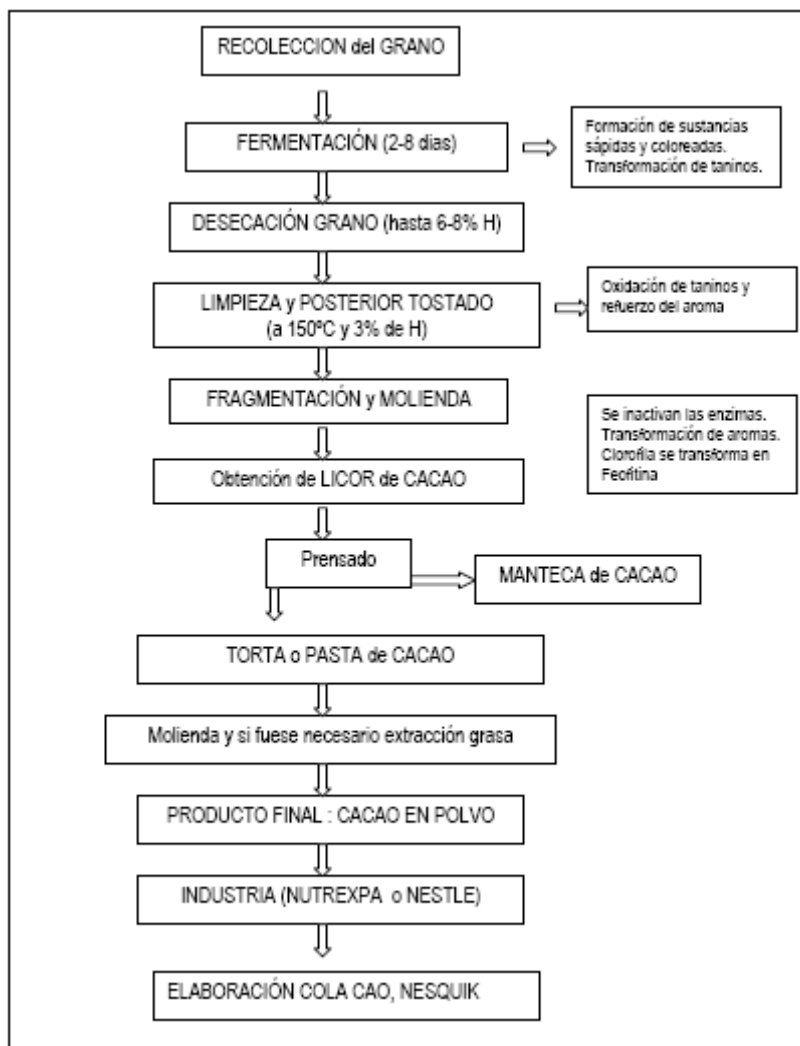
Proteínas y aminoácidos. El 60% del nitrógeno total de los granos fermentados se encuentra como proteína pura. Las enzimas de naturaleza proteica se inactivan durante el tratamiento del grano.

Al igual que café y Te, contiene sustancias estimulantes, aunque en menores cantidades. Una taza de bebida de cacao contiene 0,1 g de teobromina y 0,01 g de cafeína.

Los lípidos del cacao, se desechan durante el procesado (manteca) y es de esperar que la grasa del preparado lácteo provenga en su mayoría de la leche.

Entre los carbohidratos, la fracción soluble de elevado tamaño molecular, está compuesta por pentosanos, mucílagos. De estos polisacáridos es de esperar que los no digeribles puedan ser cuantificados como fibra soluble en la bebida final.

Figura 3. Proceso Obtención cacao en polvo.



En el grano de cacao se distinguen tres grupos principales de fenoles: flavan-3-oles, antocianinas (cianidina-3-arabinósido y cianidina-3-galactósido) y leucoantocianos (toman y col. 2007; Höner Y Frerichs, 2007; Niemenak y col. 2006). Estos últimos se desdoblan en flavan-3-oles y antocianinas cuando se calientan en presencia de pH ácido.

Actualmente se conocen más de 400 compuestos volátiles presentes en el cacao tostado. Los precursores del aroma son compuestos generados durante reacciones de fermentación, que posteriormente reaccionan entre si debido a reacciones de Maillard o degradación de Strecker(De brito y col, 2002; Counet y col. 2002; Patzold y Bruckner, 2006).

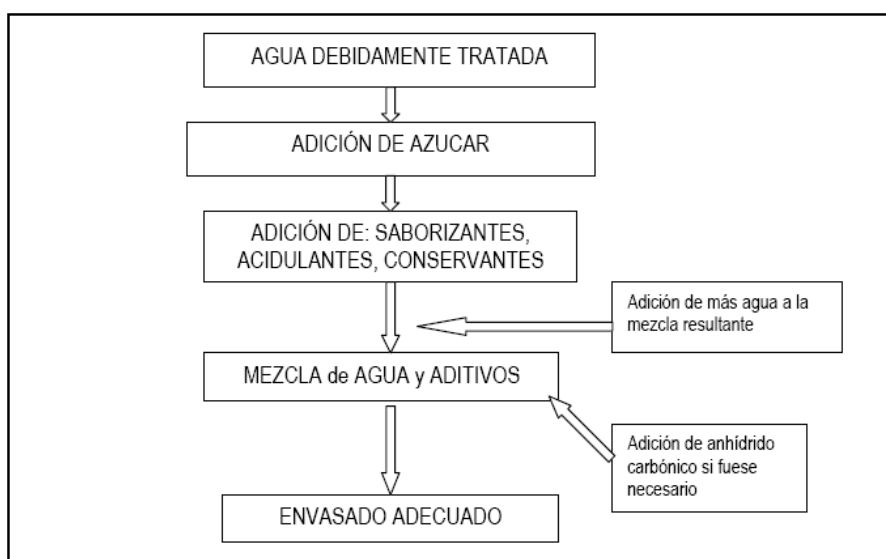
En esta memoria se ha analizado un preparado lácteo de cacao (Colacao); por lo que a la composición del cacao, habria que sumarle los componentes básicos de la leche entera: agua, lípidos (3%), enzimas y proteínas (30-35g/L), hidratos de carbono (principalmente lactosa), ácidos orgánicos, sales minerales, vitaminas (D, A)(Belitz y Grosch, 2004).

Otra sustancia a tener en cuenta es la nuez de cola (de ahí el nombre de cola cao)(compuesta por cafeína, teobromina, teofilina y taninos) así como diversos aditivos (sales minerales, azúcar) y saborizantes

PROCESO DE ELABORACIÓN DE BEBIDAS REFRESCANTES. COMPOSICIÓN

Bajo el término bebidas refrescantes se han agrupado: Trinaranjus® , Coca Cola®, Aquarius®, y tónica .

Figura 4.Esquema general de elaboración de bebidas refrescantes.



El **nombre Coca-Cola** deriva de las hojas de coca y la nuez de cola usado como aromatizante. La fórmula exacta es un legendario secreto comercial, guardado en un banco en Atlanta. El distintivo sabor a cola viene en su mayoría de la mezcla de azúcar y aceites de naranja, limón y vainilla. La concentración de cafeína en este tipo de bebidas se encuentra en 6.5-25mg/100ml), y en ocasiones (depende del fabricante de la bebida de cola) el ácido fosfórico forma parte de la fórmula (70mg/100mL).

El **Aquarius** es una bebida Isotónica (contiene similar concentración de partículas que la sangre) para deportistas con un aditivo extra de sales minerales. Mayoritariamente es una mezcla de agua, hidratos de carbono solubles y sales minerales. La proporción de hidratos de carbono debe ser la adecuada, entre 5-10%.

El trinaranjus es un refresco de naranja sin gas (sin adición de anhídrido carbónico), con un 14% de zumo. La composición del trinaranjus será la derivada del zumo de fruta que incluye su composición además del resto de conservantes y demás aditivos que pueda contener.

El **agua tónica**, o simplemente, **tónica** es un refresco carbonatado aromatizado con quinina. Originalmente, la fórmula de la tónica sólo incluía agua carbonatada y quinina, con grandes proporciones de esta última, lo que provocaba un sabor muy amargo. Con el paso del tiempo la cantidad de quinina se ha reducido a cantidades insignificantes desde el punto de vista médico, debido a los efectos secundarios que tienen altas dosis de esta sustancia, por lo que ahora se usa sólo en cantidades equivalentes a una cuarta parte de la dosis terapéutica y únicamente por su sabor. El agua tónica realmente no es más que una bebida refrescante de esencia de frutas (Belitz y Grosch, 2004) a la que se añade quinina (80 mg/L)

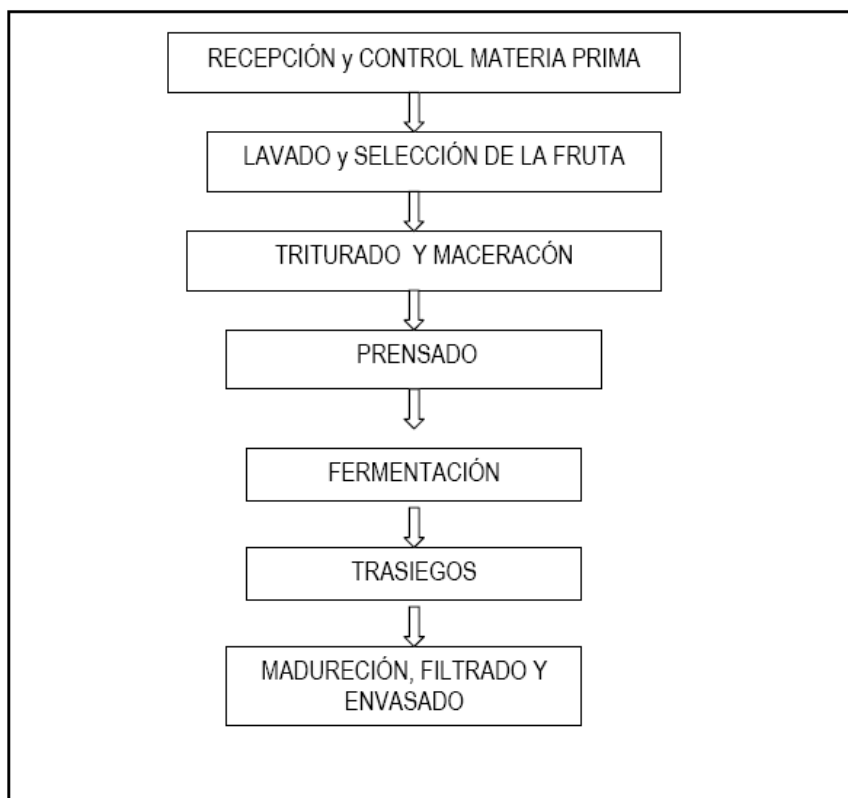
PROCESO DE ELABORACIÓN DE SIDRA. COMPOSICIÓN.

La sidra natural se elabora con manzanas, de las que se obtienen los mostos, que se mezclan convenientemente para equilibrar las características de dulzor y acidez. Se fermenta en barrica, no tiene azúcares añadidos y no contiene más gas carbónico que el que se produce durante su elaboración (figura 4). La composición de la sidra deriva de la manzana empleada en su elaboración, que a su vez depende no solo del origen de la sidra (País vasco, Navarra, León), sino del Lagar; puesto que cada uno puede emplear diferentes variedades de manzanas de sidra.

La manzana (con la que se elabora la sidra), aporta hidratos de carbono fundamentalmente en forma de azúcares como fructosa, glucosa y sacarosa, y contiene cantidades apreciables de fibra, tanto soluble como insoluble

Las manzanas son una importante fuente de flavonoides diversos (Burda y col. 2007, Madrera y col. 2006) como los flavonoles, catequinas y procianidinas. Entre los primeros, el más abundante en esta fruta es la quercetina, aunque también presenta cantidades menores de kaempferol e isoramnetina. Por último, las manzanas aportan cantidades importantes de procianidinas.

Figura 5. Proceso general para la obtención de Sidra Natural



Contienen también fenoles ácidos (cafeico, p-cumárico, clorogénico, ferúlico,) y otros compuestos fenólicos como las dihidroxichalconas (como la floretina que está presente en su forma glucosídica denominada floridzina), un tipo de flavonoides que se encuentran exclusivamente en las manzanas y sus derivados. Se localizan fundamentalmente en la piel de estas frutas (80-420 mg/kg en las manzanas Reineta), aunque también en la pulpa (16-20 mg/kg en este mismo tipo); si bien la concentración de estas sustancias depende de la variedad de manzana de que se trate.

ELABORACIÓN DE HORCHATA. COMPOSICIÓN.

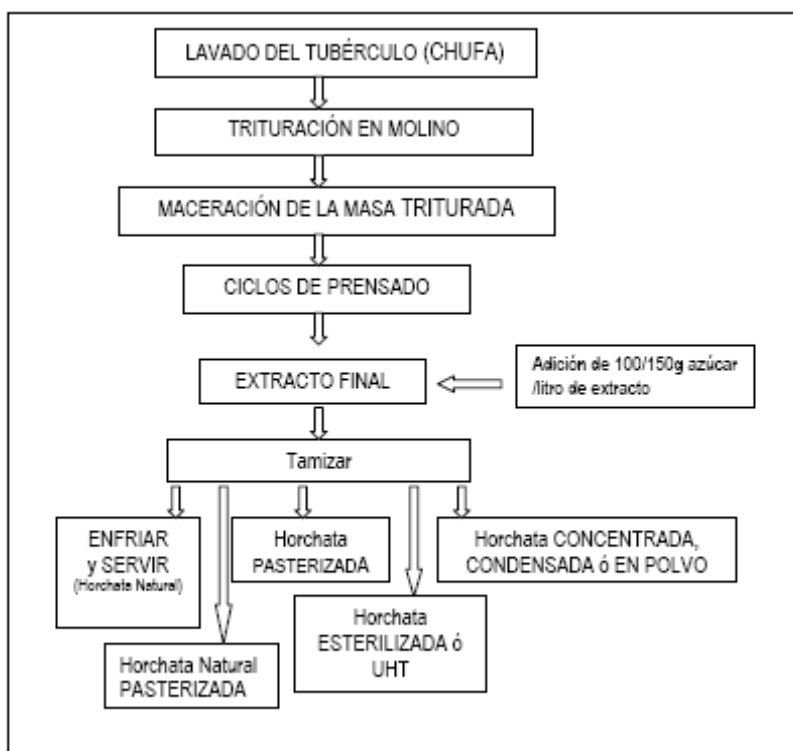
La horchata (del latín "hordeāta", "de cebada") es una bebida refrescante (también postre), preparada con agua, azúcar y chufas. La elaboración de la horchata (figura 5) empieza con el lavado del tubérculo, posteriormente pasando a un molino para su trituración, se deja un tiempo en maceración, se

prensa varias veces y se obtiene el extracto final. Para finalizar el proceso se le añade azúcar y se vuelve a tamizar.(Belitz y col. 2004)

El almidón es el hidrato de carbono más abundante en la chufa (29-34% en peso), seguido por la sacarosa (165 en peso del tubérculo). En la bebida en cambio el contenido promedio es de 12,2 % aunque puede alcanzar 14% según marca comercial

En referencia al contenido en lípidos, el aceite de chufa, es similar al de oliva, con predominio del ácido oleico y 11% de linoleico. En la horchata por otro lado el contenido en lípidos es claramente inferior (2,4-3,2 %), el contenido promedio de ácidos grasos es de 77% de oleico, 11% de palmitito y 9% de linoleico (Kapsen y col 1997; Kim y col. 2007). El contenido proteico alcanza 8.7% en tubérculo y sólo 0,6-1,4/100m l en la bebida. 5 de los 10 aminoácidos esenciales se encuentran en elevada proporción en la horchata, así como ácido aspártico y glutámico.(Temple y col. 199; Varo y col. 1998)

Figura 6. Proceso de elaboración de la Horchata.



En cuanto al contenido en fibra descrito hasta el momento, llega hasta el 10,3% en el tubérculo, pero en la horchata solo alcanza valores cercanos al 1%. (Linszen y col. 1989)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ELECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Para realizar este estudio se han seleccionado las bebidas de mayor consumo en la población española, excluyendo café, vino y cerveza (ver capítulos anteriores). Esta selección se han llevado cabo según los datos publicados por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA, 2005). Para la obtención de estos datos de consumo, el ministerio ha empleado una metodología basada en 3 tipos de encuestas: en hogares; en hostelería/restauración y en instituciones:

En consecuencia, las bebidas seleccionadas para el estudio se presentan en las tablas 2a, 2b, 2c, 2d.

Tabla 2a . Zumos analizados

TIPO de BEBIDA	MARCA COMERCIAL	INGREDIENTES
Zumo de naranja (néctar)	Disfruta (JÚVER Alimentación S.L.U.)	55% mínimo de fruta. Zumo de manzana. Acidulante, Vitamina C Edulcorantes(Accesulfamo K, Neohesperidina DC)
Zumo de naranja natural	El corte inglés	Naranjas de zumo. Origen Uruguay. CAT 1 CAL 5/6. 1 naranja=50ml zumo
Zumo de naranja y soja	Don Simón. (Hermanos J. Garcia Carrión)	15% zumo de naranja y 3% de semilla de soja. Pectinas, Antioxidantes, colorantes, azúcar.
Zumo de manzana (néctar)	Disfruta (JÚVER Alimentación S.L.U.)	55% mínimo de fruta. Puré de manzana. Acidulante, Vitamina C Edulcorantes(Accesulfamo K, Neohesperidina DC)
Zumo de piña (néctar)	Disfruta (JÚVER Alimentación S.L.U.)	50% mínimo de fruta. Zumo de piña. Acidulante, Vitamina C Edulcorantes(Accesulfamo K, Neohesperidina DC)
Zumo de piña y uva	Hacendado, fabricado por Hnos. Garcia Carrión	55% Zumo piña concentrado y 45% zumo de uva concentrado.
Zumo de melocotón (néctar)	Disfruta (JÚVER Alimentación S.L.U.)	50% de pure de melocotón. Acidulante, Vitamina C Edulcorantes(Accesulfamo K, Neohesperidina DC)
Zumo de melocotón y uva	Hacendado, fabricado por Hnos. Garcia Carrión	55% de pure de melocotón y 45% de zumo de uva concentrado
Zumo de uva (mosto)	Don Simón. (Hermanos J. Garcia Carrión)	Procedente de zumo de uva cocentrado y ácido cítrico
Zumo de Tomate	Hero España S.A.	Zumo de tomate de fruta fresca y sal.

Tabla 2b. Infusiones comerciales

TIPO de BEBIDA	MARCA COMERCIAL	Elaboración de infusión
Te Rojo	Pompadour iberica, S.A. para el corte ingles	Bolsa de infusión (1,65 g)/ 100ml agua hirviendo
Poleo- Menta	Pompadour iberica, S.A. para el corte ingles	Bolsa de infusión (1,5 g)/ 100ml agua hirviendo
Manzanilla	Pompadour iberica, S.A. para el corte ingles	Bolsa de infusión (1,5 g)/ 100ml agua hirviendo

Tabla 2c. Bebidas Refrescantes.

TIPO de BEBIDA	MARCA COMERCIAL	INGREDIENTES
Bebida Isotónica	Aquarius. The Coca Cola company	Azúcar, correctores acidez, Aromas, sales minerales, antioxidantes
Agua Tónica	Tonica Schwepps.	Azúcares, anhídrido carbónico, aroma de quinina
Bebida de Cola	Coca cola. The Coca Cola company	Agua carbonatada, azúcares, colorante, acidulante, cafeína
Refresco de naranja	Trinaranjus Schwepps.	14% de zumo concentrado de de naranja, aromas , acidulantes, azúcares.

Tabla 2d. Otras bebidas

TIPO de BEBIDA	MARCA COMERCIAL	INGREDIENTES
Bebida Láctea de cacao	Cola cao Nutrexpa	2 gr cacao original /100ml leche entera caliente
Horchata	Don Simon (hnos. J. Garcia Carrión)	Agua, Chufas, azúcar, Aromas. Estabilizadores.
Sidra Natural	Miravalles . Villaviciosa(Asturias)	Manzanas. Alcohol: 5,5 %vol

A pesar de que la horchata no se encuentra contemplada como una de las bebidas, mas consumidas (ni siquiera aparece en el libro publicado por el MAPA, 2005) y su consumo es estacional (mayoritariamente en verano) y dependiente de la region (mayoritariamente consumida en Levante); se ha seleccionado para su estudio debido a su elevado valor nutritivo y también por que al igual que la sidra natural, son productos típicos españoles y como tales merecen ser tenidos en cuenta.

2. MÉTODOS

Para aislar el complejo de fibra dietética soluble en estas bebidas se ha empleado el método descrito detalladamente en el capítulo dedicado a la metodología. Recordemos que este método incluía 4 pasos fundamentales: preparación de la muestra , tratamientos enzimáticos, diálisis y finalmente la determinación de la fibra dietética soluble y compuestos asociados en el complejo de fibra diética soluble obtenido tras la diálisis (Saura-Calixto et al. 2002; Diaz-Rubio & Saura-Calixto 2006).

En el caso de la cerveza la preparación de la muestra incluye concentrar la muestra en los casos que debido al límite de detección se consideró necesario, mientras que el caso de las infusiones ó preparado lácteo de cacao se prepararon según indicaciones de las tablas 2b y 2c, respectivamente.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1 HIDRATOS DE CARBONO Y FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE.

Las diferentes frutas (familias de frutas) se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, según sea la semilla que contenga el fruto (de hueso, de pepita, de grano), según sea el tiempo desde su recolección (fresca, desecada o pasa), Según como se produzca el proceso de maduración de la fruta, se clasifican en frutas climatéricas y no climatéricas , según el desarrollo de la fruta (frutas simples: bayas, hesperidio, pepónides, drupa,poma; frutas agregadas; frutas múltiples)

Los zumos analizados en este estudio proceden de frutas muy diferentes entre si (tabla 3)

Tabla 3. Frutas empleadas en los zumos.

Fruta	Familia	Tipo de fruta
Melocotón	<i>Rosaceae</i>	drupa
Piña	<i>Bromeliaceae</i>	Baya conjunta
Naranja	<i>Rutaceae</i>	Hesperidio
Uva	<i>Vitaceae</i>	Baya
Manzana	<i>Rosaceae</i>	Pomo

Incluso, se debe tener en cuenta que además, cada fruta tiene diversas variedades, como por ejemplo la manzana que puede ser de muchos tipos (Golden, Starking, Reineta, Verde Doncella), así como las peras (Limonera, de agua, Ercolina), las naranjas (Navel, Navel Late, Navelina, Valenciana, Salustiana y Sanguina) o las mandarinas (Satsuma y Clementinas). Del mismo modo, se debe considerar el hecho de que no solo se analizaron zumos de frutas, sino tambien zumo de tomate (hortaliza) y uno de los zumos incluye la soja (leguminosa)

Cada uno de los zumos analizados proceden de frutas de diferentes familias y además son de diferente tipo. Esto va a incidir en la concentración y tipo de polisacáridos de la fibra soluble que se han determinado en este trabajo.

En la tabla 4, se muestra la fibra dietética soluble y su composición, tanto en azúcares neutros como en ácidos urónicos de los zumos analizados en el estudio.

El tipo de fruto, es la variable más importante a tener en cuenta a la hora de elaborar el zumo, puesto que no se extrae de la misma manera el zumo de una manzana o un tomate, que el zumo de una naranja.

Tabla 4 . Fibra dietética soluble. Contenido y composición en zumos

	TIPO de ZUMO									
	Manzana	Naranja comercial	Naranja Natural	Naranja y Soja	Piña	Piña y uva	Melocoton	Melocoton y uva	Mosto	Tomate
FDS (g/250ml ^a)	0.420±0.002	0.197±0.002	0.352±0.005	0.43±0.02	0.335±0.017	0.076±0.001	0.592±0.015	0.582±0.005	0.089±0.001	1.03±0.02
FDS (g/L)	1.670±0.010	0.79±0.010	1.410±0.020	1.72±0.08	0.901±0.070	0.307±0.005	2.37±0.06	2.330±0.020	0.356±0.006	4,126 ±0.10
COMPOSICION FDS^b										
Ac. Urónicos (g/L)	0.533± 0.001	0.1±0.001	0.137±0.004	1.11±0.01	0.049±0.001	0.056±0.001	0.53±0.012	0.410±0.010	0.078±0.001	1.798±0.01
Az. Neutros (mol%)										
Glucosa	8.9±0.3	13.2±0.4	11.12±1.3	20.3±0.7	14.7±1.0	18.9±1.4	5.2±0.4	9.3±0.3	52.10±9.28	16.8±0.9
Galactosa	16.7± 0.7	42.2± 1.9	56.6± 2.2	47.3± 2.1	22.2± 1.9	25.1± 2.0	22.2± 1.6	25.0± 0.9	9.91± 1.06	32.2± 2.5
Manosa	2.8± 0.1	4.3± 0.2	3.4± 0.7	10.8± 0.8	36.7± 3.9	31.3± 2.0	5.1± 1.1	2.52± 0.06	23.15± 3.84	12.7± 1.7
Xilosa	17.5± 2.3	3.4± 0.1	0.14± 0.02	1.1± 0.1	6.3± 1.6	6.9± 1.2	6.9± 1.6	17.9± 0.5	nd	21.9± 1.3
Arabinosa	50.94± 3.4	36.87± 1.0	28.4± 3.0	20.7± 1.3	20.2± 1.6	17.8± 2.2	60.0± 1.9	45.2± 0.5	15.59± 5.6	16.6± 0.9
Fucosa	2.9± 0.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ramnosa	0.21±0.01	0.32±0.06	0.5±0.1	nd	nd	nd	0.27±0.06	0.14±0.02	0.283±0.401	0.42±0.03

^a volumen típico de un vaso de zumo.

^b Fibra dietética soluble

Igualmente sucede con la soja. La denominada semilla de soja es una leguminosa de alto valor nutritivo con una composición en carbohidratos muy diferente a la que pueda tener una fruta, además de celulosa, galactomananos, posee unas glicoproteínas muy específicas (hemaglutinina) y una concentración apreciable de oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa) (Karr- Lilienthal y col 2005).

Aunque el zumo de tomate es el zumo con una mayor concentración de FDS (4.126g/L) (tabla 4 a), se debe considerar de manera diferente a los demás zumos puesto que es una hortaliza y no una fruta.

En la tabla 4 a se observa como el zumo (néctar) con un mayor concentración de FDS es el zumo de melocotón y el zumo de melocotón y uva (2.37g/L y 2.3 g/L respectivamente), mientras que el zumo con menor concentración es el zumo de piña y uva (0.307g/L) y el mosto (0.356g/L).

Las pectinas y hemicelulosas van a ser los polisacáridos no digeribles mayoritarios en la FDS de estas bebidas. Tiene su origen en la pared celular y en la lamina media de las frutas; durante la elaboración del zumo debido a la extracción y/o presión son capaces de solubilizarse y/o depolimerizarse y pasar al zumo. En este sentido un paso crítico en la elaboración de los zumos es la clarificación. Schols y col. (1991) describieron la importancia de la técnica empleada para clarificar y estabilizar los zumos (licuefacción enzimática, ultrafiltración..), llegando a la conclusión de que la cantidad de polisacáridos solubilizados (principalmente en zumo de manzana) era mayor cuando se empleaban métodos enzimáticos.

En el caso **del zumo de manzana** el método más común consiste en emplear tratamiento enzimático seguido de ultrafiltración. De este modo se logra un zumo de manzana rico en pectinas disueltas (Rouau y Thibault, 1984), con gran concentración de ramnogalacturonano(RG) y arabinogalactanos (AG); Este hecho concuerda con los resultados presentados en la tabla 4 a .

Según esta tabla la FDS del zumo de manzana es rico en Arabinosa, galactosa (50.95 % y 16.7% mol respectivamente) y ácidos urónicos (0.533 g/L), por lo que se podría afirmar la presencia de arabinogalactanos como polisacáridos mayoritarios en la FDS del zumo (néctar de manzana). Se aprecia cierta concentración de fucosa que no aparece en otros zumos, debidos a la presencia de fucogalactoxiloglucano . Polisacárido del que no se han encontrado referencias en otros zumos.

Las pectinas del zumo que son solubles en medio alcohólico se caracterizan por un elevado grado de metilación y una elevada concentración (75%) de ácidos urónicos. Sin embargo como era de esperar las pectinas que forman parte de la fibra soluble (en agua), tienen una menor concentración de ácidos urónicos (33%)y también un menor grado de metilación.

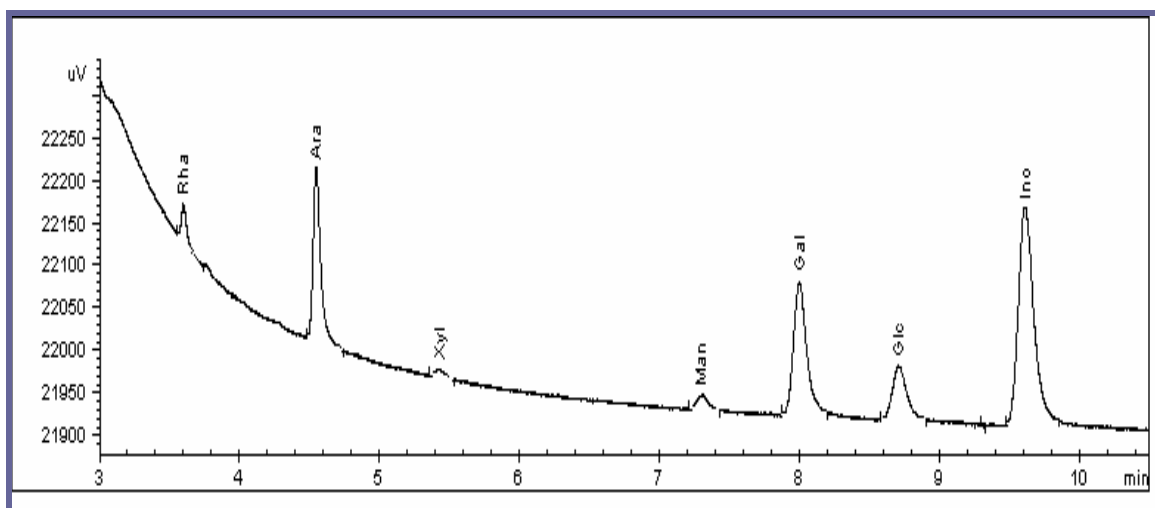
Del mismo modo, en zumo de melocotón ; melocotón y uva así como en el zumo de naranja (natural y comercial) y naranja y soja , arabinosa y galactosa son los monosacáridos mayoritarios.

Sin embargo la concentración de FDS del zumo de naranja natural es el doble que la encontrada en el zumo comercial, esto se debe en primera instancia al proceso de elaboración y después la variedad de naranja.

En la elaboración del zumo comercial se han realizado diversos procesos que conllevan tratamientos térmicos que inducen pérdida (despolimerización y/o degradación) de pectinas (Garau y col 2007) así como los tratamientos de clarificación para evitar coloides, los cuales pueden arrastrar sustancias pécticas con ellos, mientras que el zumo natural se ha realizado con un exprimidor doméstico.

Estos procesos influyen también en la composición de los polisacáridos, puesto que los tratamientos térmicos al degradar las pectinas, influyen en la composición final de dicha pectina; En la figura 7 podemos observar un cromatograma tipo que representa la composición en azúcares neutros de la FDS .

Figura 7 Cromatograma de azúcares neutros presentes en la FDS del zumo de naranja comercial

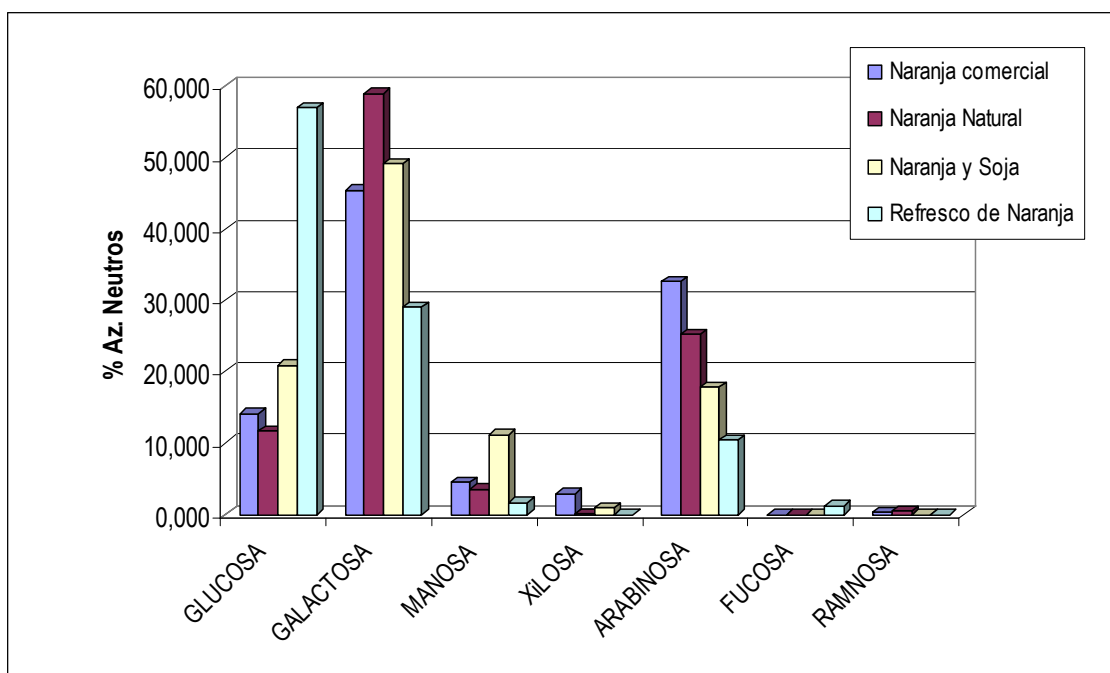


En la figura 8 se observa una comparación de la concentración de los azúcares neutros presentes en los diferentes zumos de naranja analizados (incluido el refresco de naranja). De esta manera se observa claramente que a pesar de ser siempre arabinosa y galactosa los mayoritarios, no están en la misma proporción.

De igual manera la presencia de xilosa y manosa, indica presencia de hemicelulosas, como xiloglucanos.

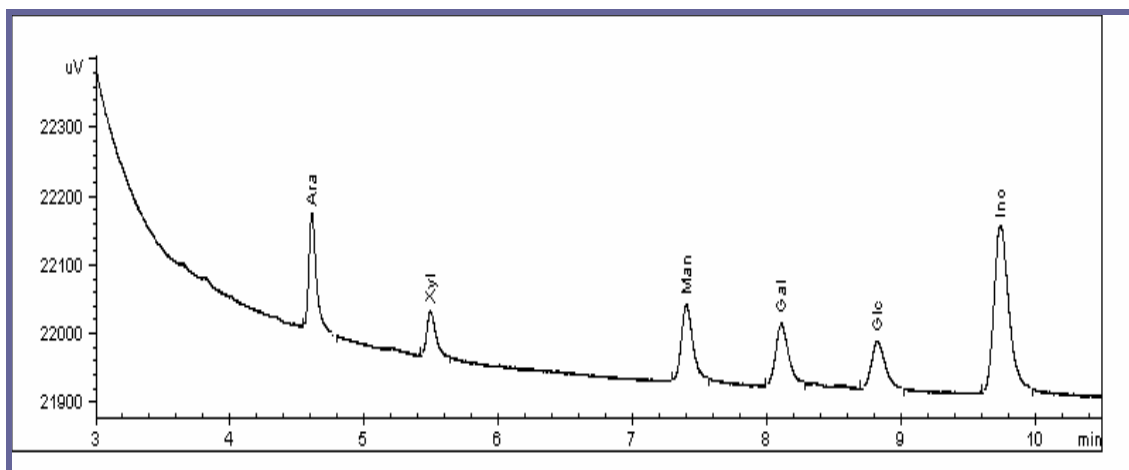
Debido a la presencia de soja en el zumo de naranja y soja, se observa una elevada concentración de ácidos urónicos (Lilienthal y col 2005).

Figura 8. Comparación de Azúcares neutros de los zumos de naranja y refresco de naranja



La composición del Zumo de piña y el zumo de piña y uva difieren en mayor medida del resto de los zumos (tabla4). En su composición son mayoritarios no solo arabinosa (17.8-20.2 mol%) y galactosa (22.2-25 mol%), sino manosa y glucosa (31.3-37% y 14.7-19 mol% respectivamente), lo que indica su mayor riqueza en hemicelulosas (Bartolomé y Ruperez , 1995), y una posible presencia de galactomananos. La diferencia en composición debe achacarse al origen botánico de la fruta, tipo (baya conjunta) y por supuesto a la tecnología empleada en elaborar el zumo, así como los aditivos que se puedan adicionar.

Figura 9. Cromatograma que muestra azúcares neutros del zumo de piña



El zumo de tomate, como se ha comentado con anterioridad es realmente el zumo con mayor concentración de FDS, pero debido que no es fruta, sino hortaliza se ha mantenido al margen. El tomate fresco tiene pectinas, hemicelulosas y celulosas y enzimas especiales para despolimerizar estos polisacáridos (pectinmetilesterasa, poligalaturonasa y celulasa) (Reinders y Thier, 1999). Estas enzimas contribuyen no solo a cambios durante la maduración, sino también a los cambios estructurales que sufren los polisacáridos durante el procesado (afectando sobretodo al producto final). Los polisacáridos diferentes del almidón (NSP) que se encuentran en el tomate fresco se distribuyen como: 28% pectinas, 23% hemicelulosas y 49% celulosas; sin embargo durante el procesado (para obtener el concentrado de pure de tomate a partir del cual se elabora el zumo) se producen cambios haciendo disminuir la concentración de estos NSP, siendo las pectinas los polisacáridos más afectados mientras las hemicelulosas apenas sufren variación.

Finalmente se obtiene un concentrado rico en hemicelulosas, y con pectinas pero solo de elevado peso molecular, compuestas fundamentalmente por arabinosa, galactosa ramnosa y galacturónico Reinders yThier, (1999). Estos datos apoyan los resultados descritos en la tabla 4 a en la que se describe como monosacárido mayoritario la galactosa (32.2 mol%) y una elevada concentración de ácidos urónicos.

En la tabla 5 se muestran los resultados de fibra dietetica soluble (ácidos urónicos y azúcares neutros) de las infusiones analizadas.

Tabla 5. Fibra dietética soluble (ácidos urónicos y azúcares neutros) de las infusiones analizadas.

	TIPO de INFUSION		
	Te Rojo	Poleo	Manzanilla
FDS (g/250ml*) ^a	0.033±0.001	0.0391±0.0005	0.0190±0.0005
FDS (g/L)	0.131 ± 0.050	0.1560± 0.0020	0.0779± 0.0020
COMPOSICION FDS^b			
Ac. Urónicos (g/L)	0.056±0.003	nd	0.0699±0.0010
Az. Neutros (mol%)			
Glucosa	11.6±1.5	34.2±2.3	99.9±3.1
Galactosa	38.5±4.5	23.9±2.0	nd
Manosa	12.1±0.4	3.6±0.5	nd
Xilosa	nd	20.8±2.2	nd
Arabinosa	36.8±1.2	17.2±1.3	nd
Fucosa	nd	nd	nd
Ramnosa	1.47±0.09	0.301±0.04	nd

^a volumen típico de una taza de infusión.

^b Fibra dietética soluble.

La infusión de te y la infusión de poleo tiene una cantidad muy similar de fibra dietética soluble (0.131g/L y 0.15 respectivamente), casi el doble que la infusión de manzanilla (0.077g/L). una causa de esto es no solo que son plantas de diferentes familias(tabla 6), sino también la parte de la planta que se va a emplear para realizar la infusión; en el caso del te y el poleo se emplean las hojas, mientras que en la manzanilla se utilizan las flores.

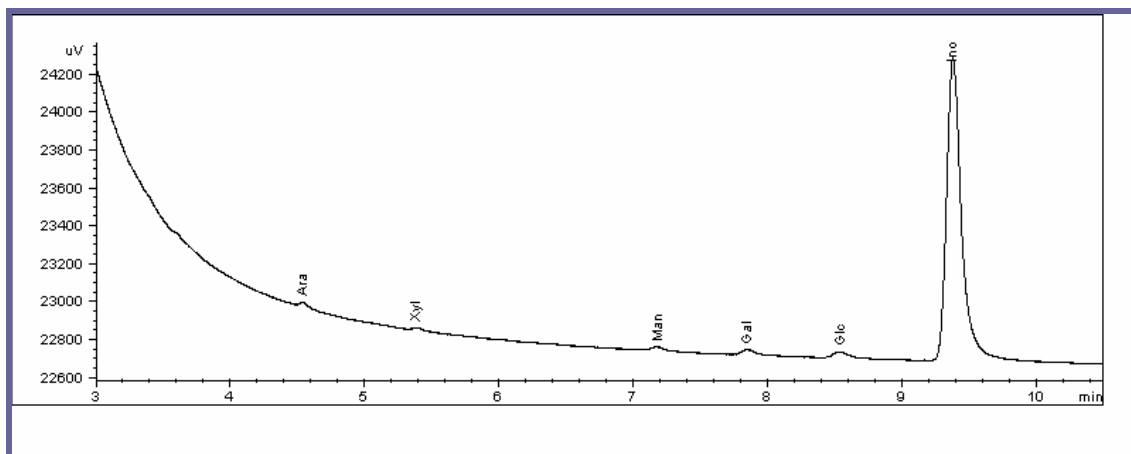
Tabla 6. Infusiones y familias

Planta	Familia	Genero
Te	Theaceae	<i>Camellia</i>
Poleo	Lamiaceae	<i>Mentha</i>
Manzanilla	Asteraceae	<i>Chamaemelum</i>

Recientemente se han identificado en el te un polisacárido (“polisacárido conjugado”) que se encuentra en unas concentraciones de 0.8-1.5% (dependiendo del te). Es un polisacárido ácido con minerales y proteína asociados. Los monosacáridos que lo forman así como el peso molecular de este polisacárido, también son variables, en función del tipo de te. Este polisacárido es soluble en agua, su composición incluye entre 3-10% de proteína(rica en glicina y alanina), 44.2 % de azúcares neutros (mayoritariamente arabinosa, galactosa) y 43.1% de ácidos urónicos (galacturónico) (Chen y col 2007).

Por otra parte otros estudios de Zhou y col. (2007), parecen indicar que el polisacárido conjugado podría ser un tipo de arabinogalactanoproteína (AGP), con arabinosa y galactosa en proporciones 1:1 y un tamaño molecular de 100-120kDa. Si establecemos una comparación entre el trabajo de Zhou y los resultados de la tabla 4b, se observa que el polisacárido mayoritario del te, parece ser AGP, con las mismas proporciones.

Figura 10.. Cromatograma de azúcares neutros de la FDS de infusión de poleo



En cuanto a la fibra dietética soluble del poleo, a pesar de tener una concentración similar a la del te, la composición es diferente, en este caso predominan xilosa (20.8%), glucosa (34.2%), y galactosa (23.9%) (figura 10), coincidiendo con los estudios llevados a cabo por Maruyama, y col. (1997), que describieron la presencia de hemicelulosas (xiloglucano) y pectinas.

Sin embargo la infusión de manzanilla debe su diferente concentración y composición de fibra dietética soluble, a la presencia de una cantidad considerable de polisacáridos solubles en agua en las flores. Estos polisacáridos pertenecen al grupo de hemicelulosas, pectinas y fructanos (Fuller y col 2000, Fuller y col. 1991).

En la siguiente tabla (tabla 7). se describen los resultados de fibra dietética soluble en refrescos y otras bebidas de la dieta. En el caso de los refrescos, son bebidas comerciales artificiales, preparadas por mezcla de diversas sustancias de las que pocas son de origen natural. En estas bebidas el comerciante afirma presencia de hidratos de carbono pero sin especificar (pueden ser monosacáridos, polisacáridos).

Figura 11 Cromatograma de azúcares neutros de la FDS de la bebida isotónica

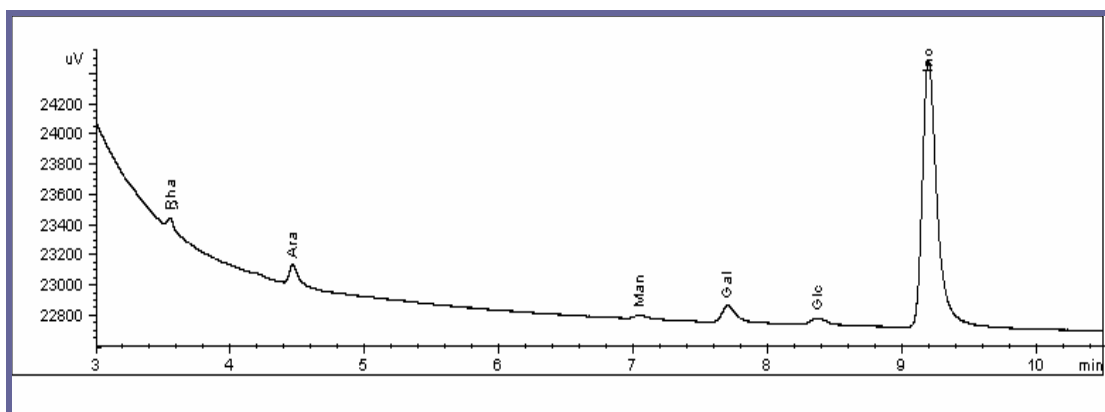
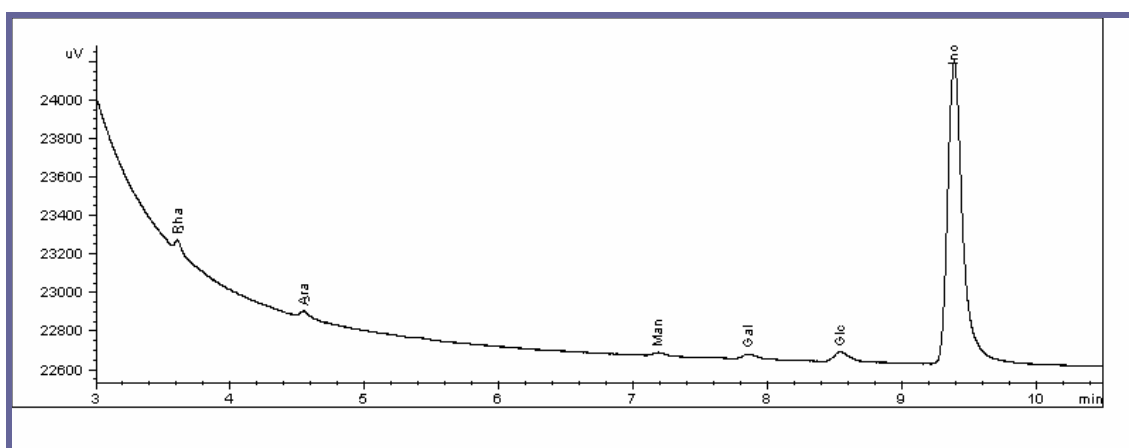


Figura 12 Cromatograma de azúcares neutros de la FDS del refresco de naranja



Los resultados aquí presentados muestran débil presencia (0.02-0.084g/l) de supuesta FDS en refrescos de cola, tónica y bebida isotónica; al ser concentraciones tan pequeñas y haberse determinado empleando un método colorimétrico (que puede tener interferencias de otros compuestos), podría pensarse que esta FDS cuantificada es un artefacto que provoca interferencias ó algún polisacárido que cumple las condiciones necesarias para ser cuantificado como FDS.

Sin embargo, es interesante observar los resultados obtenidos al realizar medidas cromatograficas (figura 11,12), observándose siempre que el monosacárido mayoritario es glucosa, excepto en el caso de la bebida de cola que es la xilosa. En este último caso al desconocer por completo la composición real de la bebida de cola, solamente se puede deducir que esto podría indicar la presencia de algún polisacárido de estructura similar a las hemicelulosas.

Tabla 7. Fibra dietética soluble. Contenido y composición en bebidas refrescantes y otras bebidas

	TIPO de BEBIDA						
	Refresco de cola	Bebida Isotónica	Agua Tónica	Refresco naranja	Horchata	Sidra	Bebida de cacao
FDS (g/250ml*)	0.0210±0.0002	0.0060±0.0002	0.0049±0.0002	0.060±0.001	0.250±0.002	0.042±0.002	1.79±0.04
FDS (g/L)	0.0840±0.0009	0.024±0.001	0.0210±0.0009	0.239±0.004	1.00±0.09	0.17±0.01	7.17±0.18
COMPOSICION FDS							
Ac. Urónicos (g/L)	nd	0.007±0.0001	nd	0.108±0.002	nd	0.006±0.00041	0.15±0.004
Az. Neutros (mol%)							
Glucosa	39.6±3.6	32.7±2.6	98.2±3.4	56.75±4.3	38.73±4.8	4.27±0.3	20.4±1.5
Galactosa	4.3± 3.3	47.8± 3.4	nd	27.61±2.8	44.3±4.1	7.3±0.6	22.9±2.8
Manosa	0.63±0.04	nd	0.89±0.09	1.73±0.2	7.4±3.0	7.7±0.4	4.8±0.8
Xilosa	51.2±5.2	nd	nd	0.011±0.001	3.0±0.3	28.6±2.9	20.3±3.1
Arabinosa	3.6± 0.3	19.5± 4.1	nd	13.9±1.1	6.6±0.5	42.7±2.0	31.2±3.8
Fucosa	0.67±0.08	nd	nd	1.4±0.1	nd	5.9±0.3	0.35±0.08
Ramnosa	3.6±0.2	3.6±0.2	nd	nd	nd	2.2±0.1	0.07±0.007

^a volumen típico de un vaso de bebida.

^b Fibra dietética soluble.

Entre las bebidas refrescantes propiamente dichas (bebida de cola, bebida isotónica, agua tónica, refresco de naranja), es el refresco de naranja en el que se observa una mayor concentración de FDS (0.239 g/L); la causa, probablemente sea la presencia (según el fabricante) de un 16 % de zumo de naranja, de hecho, si se compara este valor (0.239) con el 16% de la FDs obtenida en los zumos de naranja analizados(0.12 g/L en comercial-0.226 g/L en zumo natural), los valores concuerdan.

En cuanto a las otras bebidas (horchata, sidra, bebida de cacao), debido a su diferente naturaleza, deben tratarse de manera distinta. Entre estas bebidas, la de menor contenido en FDS es la sidra, incluso bastante inferior al contenido de FDS en el zumo de manzana (1.67 g/L tabla 4a); la diferencia entre el zumo y la sidra probablemente se deba a dos razones, el método de elaboración (no se elabora de la misma manera el zumo, que la sidra natural, que conlleva incluso proceso fermentativo) y la variedad de manzana; La elaboración de la sidra protegida por la D.O. "sidra de Asturias", se ha de realizar exclusivamente con manzana de sidra de las variedades comprendidas dentro de los siguientes bloques tecnológicos: **Ácido:** Duroña de Tresali, Blanquina, Limón Montés, Teórica, San Roqueña, Raxao, Xuanina y Fuentes **Dulce:** Verdialona y Ernestina **Ácido-amargo:** Regona **Amargo:** Clara **Amargo-Semiácido:** Meana **Dulce-amargo:** Coloradota **Semiácido:** Carrio, Solarina, De la Riega, Collaos, Perico, Prieta y Perezosa **Semiácido-amargo:** Panquerina. Se ha de significar que hay variedades de mesa que no se admiten en la Denominación de Origen y, por lo tanto, quedan prohibidas, como Golden delicious ó Granny smith .

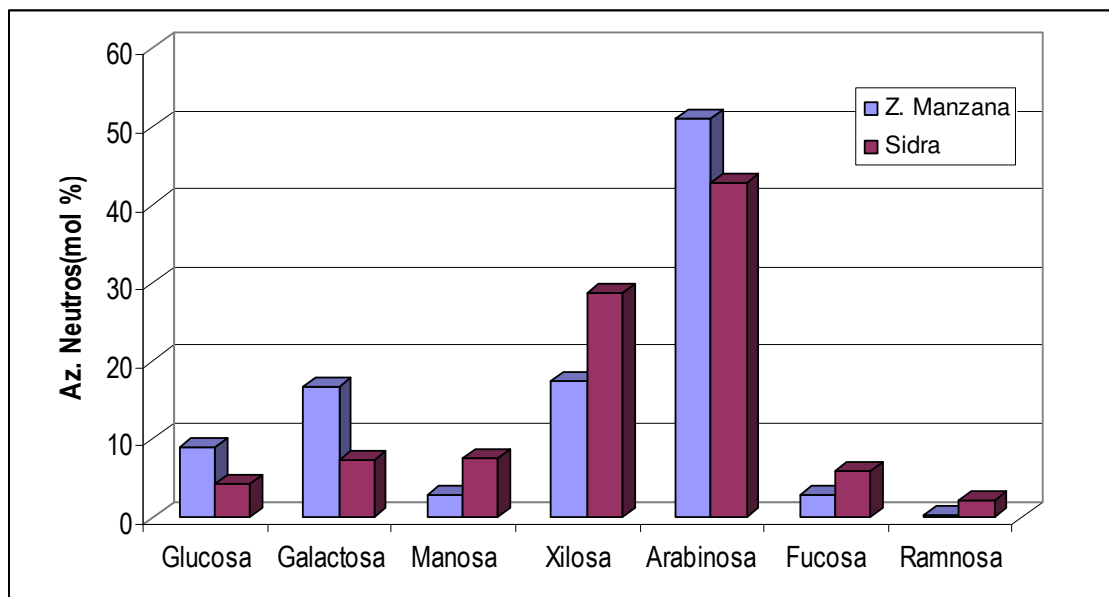
El contenido en fibra de la horchata, es digno de tener en cuenta, puesto que hasta el momento no se había realizado un estudio en profundidad de esta bebida, y según este trabajo tiene una concentración de fibra (1.004g/L)similar a la de un zumo de naranja, aunque su composición sea bastante diferente; esta diferencia en composición se puede explicara no solo por la elaboración de la bebida, sino por el tipo de materia prima; la chufa (*Cyperus sculentus*) es un tubérculo y como tal es rico en almidon , celulosa(Cortes y col 2004; Cortes y col. 2005) y algunos estudios hablan de la presencia de hemicelulosas (Parker y col 2000). Lo que explicaria que en la elaboración de la bebida parte de las hemicelulosas (solubles) sean extraídas.

En cuanto a la bebida de cacao, que al fin y al cabo es la bebida de todo el estudio con mayor cantidad de fibra dietética soluble (7.17 g/L, solo superado por el café soluble , con 7.5 g/L), se observa en la composición de la FDS, que los azúcares mayoritarios son arabinosa(31.2 mol%), galactosa(23 mol%) y xilosa (20.3 mol %); esto parece indicar que los polisacáridos mayoritarios en esta bebida son sustancias pécticas, derivado de la semilla de caco original, que han sobrevivido a todo el procesado.

Redgwell y Hansen (2000) , Redgwell y col. (2002), describieron que los principales polisacáridos presentes en la semilla de cacao eran polisacáridos pécticos; concretamente la pared

celular de la semilla de cacao esta compuesta por 61% de pectinas ricas en arabinosa y galactosa y 11% de hemicelulosas, principalmente xiloglucano. Este xiloglucano puede estar fucosilado (Redgwell y Hansen 2000), lo que explicaría la pequeña concentración de fucosa encontrada en este trabajo (0.35 g/L)

Figura 13. Azúcares neutros de la fibra soluble. Comparación Sidra y zumo de manzana



2. COMPUESTOS ASOCIADOS A LA FIBRA DIETETICA SOLUBLE DE LAS BEBIDAS. COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROTEINA RESISTENTE

Los compuestos fenólicos y la proteína, son otros constituyentes importantes en las bebidas analizadas

En la tabla 8 se muestran los compuestos fenólicos determinados en los zumos, junto con la capacidad antioxidante correspondiente a estos compuestos fenólicos.

Al igual que en el vino, la cerveza y el café, se han detectado compuestos fenólicos en la solución de FDS, que parecen estar asociados a los polisacáridos de la fibra dietética soluble. Estos fenoles se han cuantificado empleando el método Folin-Ciocalteu (tabla 8), así como su capacidad antioxidante.

Entre todos los zumos, el que posee una mayor concentración de compuestos fenólicos es el zumo de piña (926mg/L) seguido del zumo de manzana (906 mg/L), sin embargo no son éstos zumos los que muestran mayor capacidad antioxidante. Se puede decir que no existe correlación entre los fenoles cuantificados en los zumos y sus actividades antioxidantes. Este hecho se explicaría por la presencia de

antioxidantes naturales propios de la fruta que llegan al zumo, como la vitamina C, terpenoides, carotenoides (Meléndez-Martínez y col. 2006) que contribuyen a la actividad antioxidante y no se han determinado en este trabajo.

Tabla 8 Polifenoles totales y asociados. Capacidad antioxidante

		COMPUESTOS FENÓLICOS ^a	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^b	
			FRAP	ABTS*
Manzana	Zumo	903±8	3479±163	1918±157
	Solución de FDS ^{c,d}	49±1	296±5	256±6
Naranja comercial	Zumo	529±22	4036±105	2652±68
	Solución de FDS ^{c,d}	155±2	336±6	116±3
Naranja natural	Zumo	622±12	2966±84	289±92
	Solución de FDS ^{c,d}	63±2	289±5	59±2.3
Naranja y soja	Zumo	535±7	2126±133	353±5
	Solución de FDS ^{c,d}	73±0.2	378±15	217±4
Piña	Zumo	926±32	1527±73	1442±22
	Solución de FDS ^{c,d}	45±2	69±1	59±1
Melocoton	Zumo	760±32	2915±116	1862±21
	Solución de FDS ^{c,d}	180±4	452±18	206±3
Piña y uva	Zumo	400±13	2455±68	1183±20
	Solución de FDS ^{c,d}	29±1	162±4	154±2
Melocoton y uva	Zumo	816±8	3118±182	1958±86
	Solución de FDS ^{c,d}	159±1	400±9	409±5
Mosto	Zumo	493±20	2276±62	1589±16
	Solución de FDS ^{c,d}	96±1	479±19	242±8
Z.Tomate	Zumo	449±20	2902±156	1605±42
	Solución de FDS ^{c,d}	140±3	306±2	452±6

^a Fenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.

^b Capacidad antioxidante expresada en mmoles Trolox /Litro de vino

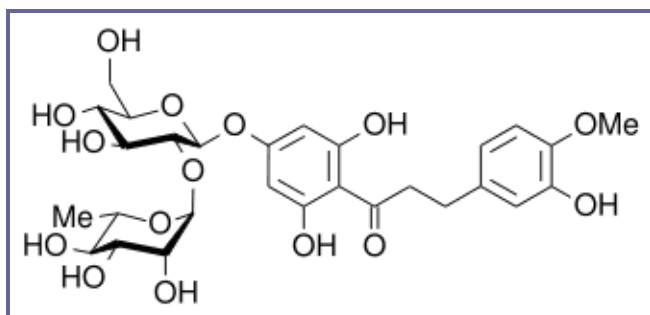
^c Solución de fibra dietética soluble.

^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble; determinados por método Folin-Ciocalteu

En este estudio se han analizado zumos (en la mayoría de los casos néctares), comerciales (excepto el zumo de naranja natural), lo que implica la presencia de antioxidantes naturales y adición de

aditivos como neohesperidina DC (derivado de chalconas, que se emplea como edulcorante) y que debido a sus orígenes fenólicos es probable que contribuya a la actividad antioxidante.

Figura 14. Estructura de la neohesperidina DC



También es de uso común el empleo de ácido ascórbico como aditivo (además de poder encontrarse de manera natural) (Gardner y col 2000.)

Como se ha señalado con anterioridad, las frutas empleadas para la elaboración de los zumos son muy diversas entre sí, por lo que no solo la concentración, sino también la composición fenólica será muy diferente (tabla 9).

Tabla 9. Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos en zumos

ZUMO	COMPUESTOS FENÓLICOS ^b	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^a (%)			
		Ácidos Benzoicos	Ácidos Hidroxicinámicos	Flavonoides ^c	Antocianinas
Manzana	903±8	19±1	17±2	64±4	nd
Naranja comercial	529±22	6±0.4	34±3	60±4	nd
Naranja natural	622±12	6±0.5	10±1	84±7	nd
Naranja y soja	535±7	6±0.3	7±0.6	87±6	nd
Piña	926±32	12±1	17±1	71±5	nd
Melocoton	760±32	9±0.4	34±2	57±5	nd
Piña y uva	400±13	11±1	39±3	50±4	nd
Melocoton y Uva	816±8	7±0.6	22±2	71±6	nd
Mosto	493±20	31±2	27±2	42±3	nd
Z.Tomate	449±20	47±3	12±1	41±4	nd

^a Polifenoles determinados por CLAE (Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^b Polifenoles totales cuantificados por el método Folin Ciocalteu. Expresados como mg. equivalentes de Ác. gálico/Litro de infusión.

^c Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas,

Existe cierta correlación cuando se comparan compuestos fenólicos de zumos de frutas comerciales de la misma familia, como el zumo de piña y uva frente al zumo de piña ($R^2=0.9999$).

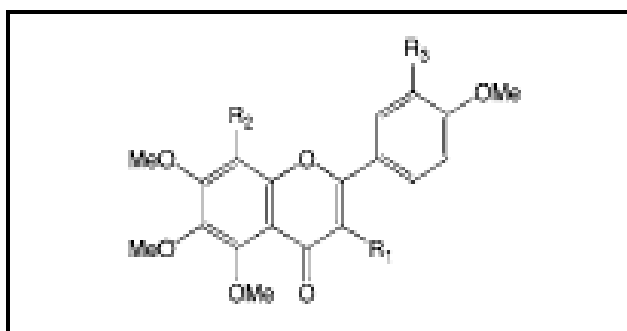
Algo similar sucederá con los compuestos fenólicos asociados. Al tener cada fruta no solo compuestos fenólicos diferentes, sino también una diferente composición en cuanto a los polisacáridos de la fibra dietética, tampoco existe correlación en cuanto al porcentaje de compuestos fenólicos asociados.; es decir, el zumo con mayor porcentaje de compuestos fenólicos en su origen no es el zumo con más fenoles asociados.

En definitiva tanto la presencia de ácido ascórbico como la composición fenólica de los zumos (tabla 9) son importantes a la hora de poder establecer correlaciones con la actividad antioxidante, por ejemplo en el zumo de manzana existe en concentraciones apreciables la chalcona floridzin-glicosido (Kahle y col. 2005.; Bengoechea y col.1997), mientras que en los zumos de naranja la vitamina C (39mg/100g zumo según McCance and Widdowson's 2004) y las flavanonas como la naringenina juegan un papel más importante que en otros zumos (Bengoechea y col.1997).

Los compuestos flavonoides son los fenoles mayoritarios en la naranja y cítricos en general. En zumos, los flavonoides se encuentran habitualmente en forma de glicósidos, puesto que las agliconas tienen un marcado carácter lipofílico y menor solubilidad en agua.(Gattuso y col. 2007) .Sin embargo en algunos casos como sucede en el néctar de melocotón la concentración de ácidos fenólicos es muy similar a fenoles neutros, dato descrito con anterioridad por (Andreotti y col. 2006).

Existen un grupo de compuestos fenólicos denominados polimetoxiflavonas .(Gattuso y col. 2007) (PMFS), como quercetogetina, tangeretina, nobletina (estructura base figura 15) los cuales se encuentran como componentes de la fracción lipofílica de la piel de los cítricos (como la naranja) .(Gattuso y col. 2007).

Figura 15 Estructura base de polimetoxiflavonas



Estos compuestos no aparecen (o en trazas) en los zumos realizados en el hogar, “exprimidos a mano” (zumos de naranja natural), sin embargo los zumos comerciales son ricos en estos compuestos ya

que el procesamiento industrial permite la contaminación del zumo con la piel de la fruta .(Gattuso y col. 2007), sin embargo este dato no parece coincidir con los resultados de las tablas 8 y 9 , donde se muestra una mayor concentración de compuestos fenólicos en zumo de naranja natural frente a zumo comercial, si podría explicar la no existencia de correlación entre capacidad antioxidante. Al contar con compuestos fenólicos diferentes, la actividad antioxidante también lo será.

Del mismo modo que se determinó la composición fenólica por CLAE en los zumos, se intentó llevar a cabo el mismo estudio con la disolución de FDS, pero el cromatograma no mostró señal alguna (figura 16), a pesar de los resultados obtenidos por métodos espectrofotométricos (Folin-Ciocalteu) y de actividad antioxidante, así como el espectro de absorción (figura 10)

Figura16. Cromatograma por CLAE zumo melocotón vs FDs

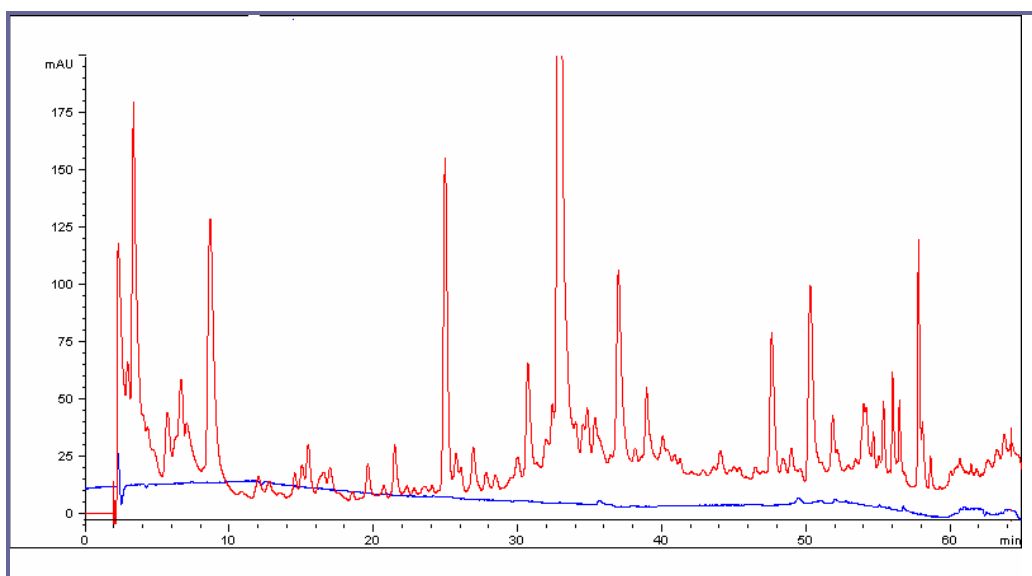
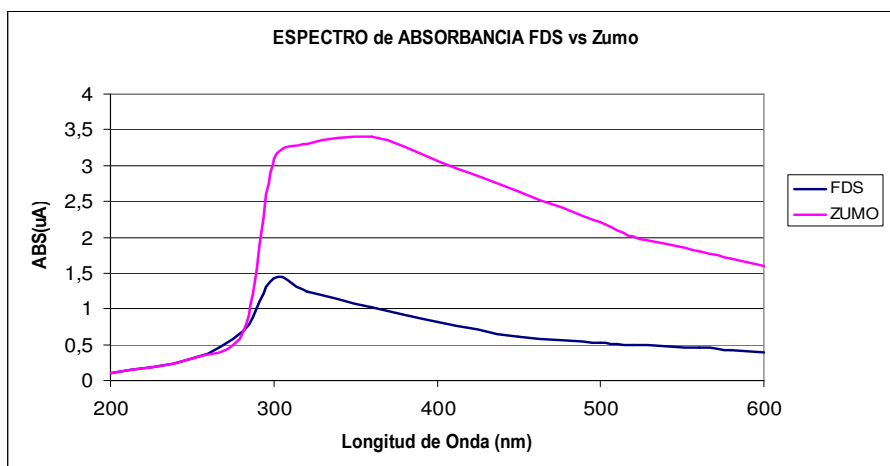


Figura 17. Espectro de absorbancia del zumo de naranja vs FDS



En consecuencia se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con celulasa, al igual se había realizado en el caso del vino, cerveza ó café. Los resultados obtenidos empleando este tipo de hidrólisis se muestran en la siguiente tabla (tabla 10)

Tabla 10 Polifenoles asociados hidrolizados y capacidad antioxidante en zumos

Solución de FDS de zumo Hidrolizado ^a	Compuestos Fenólicos Hidrolizados ^b	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^c (%)				ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	
		Acidos Benzoicos	Acidos Hidroxicinámicos	Flavonoides ^d	Antocianinas	FRAP	ABTS*
Manzana	197±4	30±3.1	28±2	42±3	nd ^e	392±18	310±39
Naranja	206±6	11±1.0	57±5	32±2	nd	363±12	271±11
Naranja Natural	275±5	3.7±0.2	23±2	73±6	nd	482±18	264±23
Naranja y Soja	239±1	21±2.0	32±2	48±4	nd	237±17	152±8
Piña	141±1	6.8±0.4	49±4	44±3	nd	150±1	146±12
Melocoton	201±3	12±1.0	14±1	74±6	nd	463±3	289±14
Pina y Uva	182±2	8.7±0.6	58±5	33±3	nd	322±17	354±5
Melocoton y Uva	181±2	5.1±0.3	45±3	50±4	nd	299±6	429±31
Mosto	214±10	17±2.0	26±2	57±4	nd	502±11	406±4
Tomate	425±12	7.8±0.4	19±1	74±5	nd	756±9	918±8

^aDisolución de fibra dietética soluble (FDS) hidrolizada con celulasa

^c Polifenoles determinados por CLAE(Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^b Polifenoles determinados en la disolución de fibra (FDS) hidrolizada con celulasa, por el método Folin iocalteau.(mg ac. gálico/Litro zumo)

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas,

^eno detectado

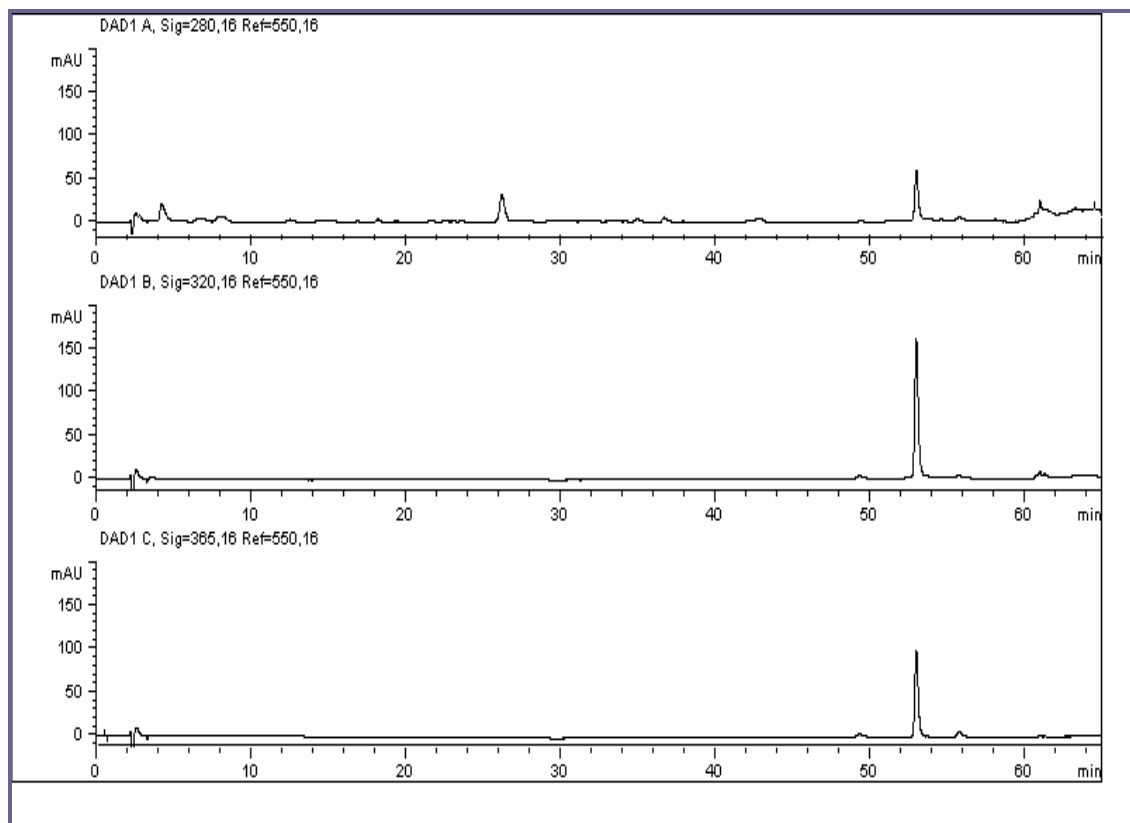
En esta tabla se muestran los resultados obtenidos espectrofotométricamente y por CLAE, así como la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos liberados por la celulasa.

Del mismo modo en la figura 18 se muestra un cromatograma de cómo se observarían los “picos” obtenidos empleando esta hidrólisis enzimática.

Al igual que sucedía con los compuestos fenólicos en los zumos originales, no existe correlación alguna entre estos compuestos liberados y sus respectivas capacidades antioxidantes. Cabe destacar, sin embargo, como se produce un aumento en los fenoles ácidos en detrimento de los flavonoides, hecho que concuerda con el dato bibliográfico (Kroon y col. 1997), que explica la unión de los compuestos fenólicos de tipo ácido (como ferúlico) con los azúcares (como arabinosa); y éstos azúcares a su vez pueden encontrarse formando parte de los polisacáridos de la fibra. De hecho existen ciertas correlaciones entre algunos grupos de fenoles y ciertos azúcares determinados en la fibra, como la que se observa al

comparar todos los zumos que contienen uva (piña y uva, melocotón y uva, y mosto), se observa clara correlación entre glucosa y ácidos benzoicos ($R^2= 0.996$).

Figura 18 Cromatograma (CLAE) de los polifenoles asociados en FDS hidrolizada Zumo naranja natural



La presencia de una cantidad relativamente alta de flavonoides en el zumo de naranja es el resultado de muchas y diferentes combinaciones que suceden entre las agliconas polihidroxiladas y un número determinado de mono y disacáridos ,principalmete glucosa, galactosa y ramnosa. Estos azúcares a su vez podrían encontrarse formando parte de los polisacáridos de la Fibra diétetca soluble, por lo que esos fenoles se considerarían asociados a esta fibra dietética.; de hecho es importante destacar la existencia de diversas correlaciones en los zumos de naranja: galactosa frente a los flavonoides ($R^2=0.99$), manosa frente a hidroxibenzoicos($R^2=0.99$) o la xilosa frente a hidroxicinámicos ($R^2=0.999$).

En las infusiones por otra parte, si se observa clara correlación entre los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante, por el método FRAP ($R^2=0.99$), aunque no por ABTS* (tabla11), esto se pude explicar si nos dirigimos a la tabla 10, en la que se observa la composición fenólica determinada por CLAE.

Tabla 11. Polifenoles totales y asociados , y capacidad antioxidante en infusiones

		COMPUESTOS FENÓLICOS ^a	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^b	
			FRAP	ABTS*
Te Rojo	Infusión	532±26	3818±72	4486±168
	Solución de FDS ^{c,d}	224±2	1182±25	118±23
Poleo	Infusión	880±12	6920±128	3680±23
	Solución de FDS ^{c,d}	209±3	1337±34	1044±21
Manzanilla	Infusión	140±9	2409±26	913±8
	Solución de FDS ^{c,d}	32±1	218±6	123±6

^a Fenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.

^b Capacidad antioxidante expresada en mmoles Trolox /Litro de vino

^c Solución de Fibra dietética soluble.

^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble; determinados por método Folin-Ciocalteu.

En la tabla 12 se observa claras diferencias entre las infusiones, la mas significativa quizá sea la detección de antocianinas en la infusión de poleo y no en las otras dos.

Zou, ycol. (2002) determinaron que los principales compuestos fenólicos en el te rojo (Pu erh) eran los flavan-3-oles (principalmente epicatequina), aunque en menor concentración que en el te verde debido al proceso fermentativo que sufre en su elaboración. Durante este proceso la concentración de estos compuestos disminuye por condensación o por oxidación (generado ácidos o teaflavinas ó derivados ácidos de teaflavinas). Probablemente por ello tiene una menor concentración de flavonoides.

Tabla 12 Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos

TIPO INFUSION	de COMPUESTOS FENÓLICOS ^b	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^a (%)			
		Acidos Benzoicos	Acidos Hidroxicinámicos	Flavonoides ^c	Antocianinas
Te Rojo	532±26	1.1±0.1	40±3	59±5	nd
Poleo	880±12	0.33±0.02	23±2	76±6	0.7±0.05
Manzanilla	140±9	45±4	7.7±0.5	48±3	nd

^a Polifenoles determinados por CLAE(Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^b Polifenoles totales cuantificados por el método Folin Ciocalteu. Expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de infusión.

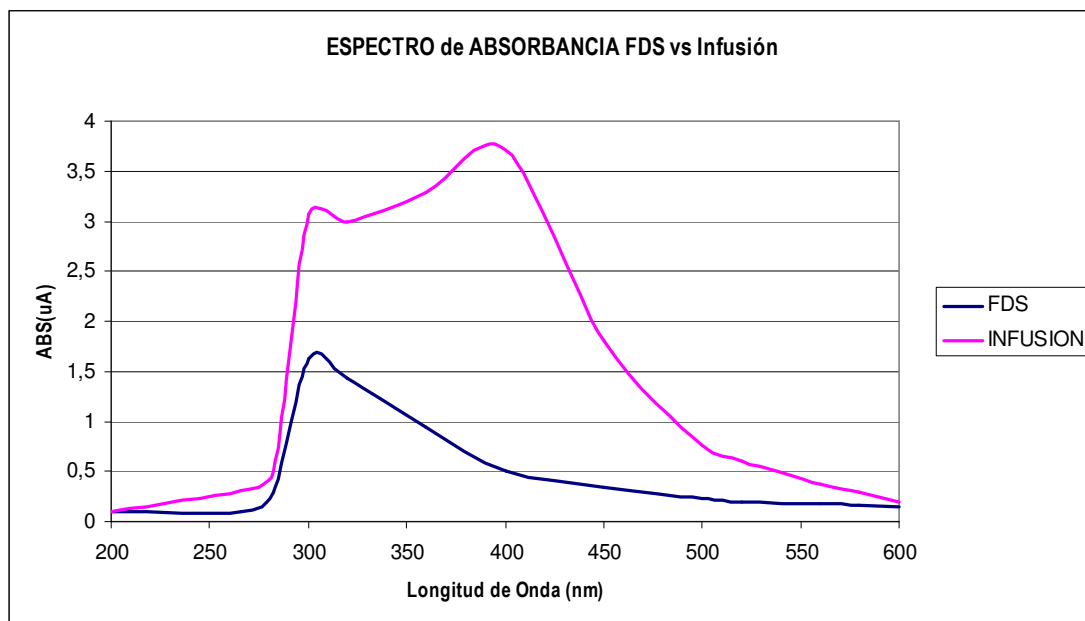
^c Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas

Según la literatura (Kosar y col 2004), el compuesto fenólico predominante en la infusión de poleo (no determinado en infusio de te o infusión de manzanilla), es la erocitrina, un compuesto fenólico

neutro, de estructura flavonoidea, lo que explicaría la elevada concentración de flavonoides. Otro dato a tener en cuenta es que a pesar de que la manzanilla tiene menor concentración de compuestos fenólicos (140 ppm), es la infusión con mayor cantidad de ácidos benzoicos.

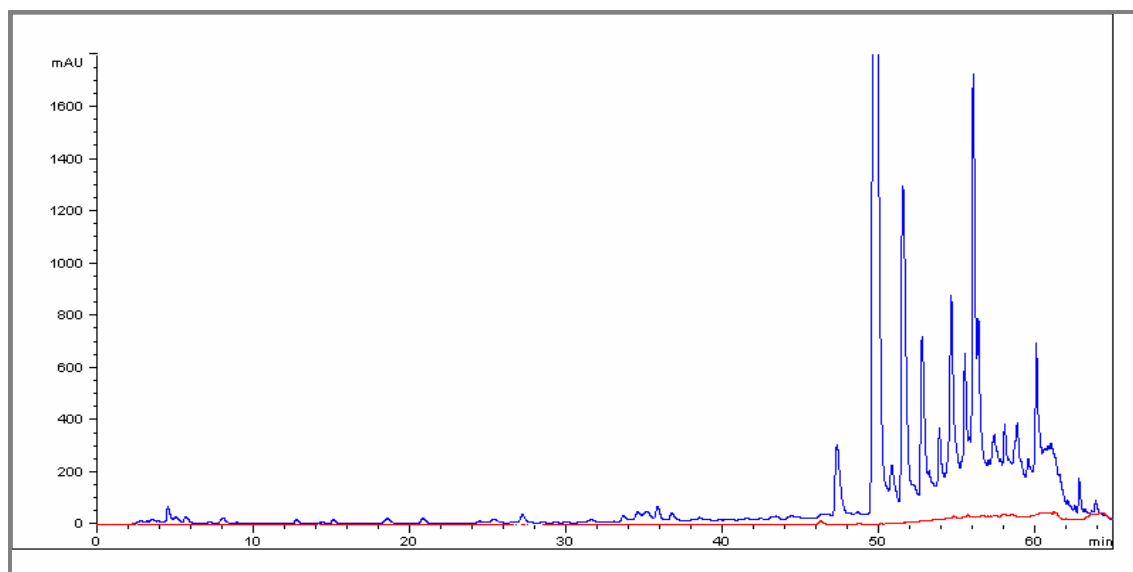
Al observarse, en la fibra dietética soluble aislada, la aparente presencia de fenoles con actividad antioxidante y mostrando un espectro de absorción con máximos en las zonas donde absorberían los fenoles (figura19), se intentó la cuantificación de estos compuestos fenólicos mediante CLAE (figura 20), pero el cromatograma obtenido de esta manera no mostraba presencia alguna de compuestos fenólicos; esto nos llevó a pensar en el hecho de que estos compuestos esten asociados a los polisacáridos de la fibra, por lo que, al igual que en los zumos, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática con celulasa, para de esta manera intentar liberar algún compuesto fenólico

Figura 19. Espectro de absorción de poleo frente a su FDS.



En color rosa se muestra el espectro de absorción de la infusión de poleo, mientras que en color azul aparece el espectro de absorción de la fibra dietética soluble de dicha infusión

Figura 20. CLAE de la infusión de poleo y su correspondiente FDS.



Cromatograma realizado a $\lambda=280\text{nm}$ (donde absorben todos los compuestos fenólicos).
En color azul se muestra la infusión, mientras que en color rojo se observa el cromatograma de la FDS

Los resultados obtenidos al emplear la hidrólisis enzimática, se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Polifenoles asociados hidrolizados y capacidad antioxidante en infusiones

Solución de FDS de Infusión Hidrolizado ^a	Compuestos Fenólicos Hidrolizados ^{a,b}	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^{b,c} (%)				ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^d	
		Acidos Benzoicos	Acidos Hidroxicinámicos	Flavonoides	Antocianinas	FRAP	ABTS
Te Rojo	491 \pm 18	9.4 \pm 0.7	nd	91 \pm 7	nd	1229 \pm 51	1259 \pm 15
Poleo	446 \pm 8	24 \pm 2	24 \pm 1	44 \pm 4	8.5 \pm 0.6	1513 \pm 92	1136 \pm 19
Manzanilla	100 \pm 7	16 \pm 1	22 \pm 2	90 \pm 7	nd	708 \pm 11	367 \pm 18

^aDisolución de fibra dietética soluble (FDS) hidrolizada con celulasa

^c Polifenoles determinados por CLAE(Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^b Polifenoles determinados en la disolución de fibra (FDS) hidrolizada con celulasa, por el método Folin iocalteau.(mg ac. gálico/Litro zumo)

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas

Mediante esta hidrólisis se han podido liberar gran cantidad de compuestos fenólicos , principalmente en la infusión de manzanilla, donde aumenta el porcentaje de flavonoides; este aumento podría indicar que en este caso los fenoles asociados de manera mayoritaria , o por lo menos los que es capaz de liberar la enzima son de origen neutro.

Sin embargo el porcentaje de compuestos fenólicos liberados por la celulasa en las otras infusiones es inferior, al igual que el porcentaje de compuestos fenólicos de tipo neutro también es menor.

En este caso existe correlación entre la actividad antioxidante determinado por ABTS* y los compuestos fenólicos hidrolizados ($R^2= 0.9995$)

El caso de *los refrescos y otras bebidas* es más complejo de explicar. En cuanto a los refrescos propiamente dichos (refresco de cola, bebida isotónica, refresco de naranja, agua tónica), existe correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante determinada por FRAP ($R^2=0.992$), pero no se observa correlación con el método de ABTS (tabla 12).

La concentración de compuestos fenólicos en el refresco de naranja puede explicarse por el hecho de tener en su composición un 16% de zumo de naranja . mientras que los compuestos fenólicos que aparecen en la bebida de cola podrían deberse a la presencia de nuez de cola , cuya composición incluye flobafenos y xantinas, que darían positivo en el método Folin-Ciocalteu.

Tabla 14. Polifenoles totales y asociados. Capacidad antioxidante en otras bebidas

		COMPUESTOS FENÓLICOS ^a	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^b	
			FRAP	ABTS*
Horchata	Zumo	532±11	1905±110	317±21
	Solución de FDS ^{c,d}	330±2	489±23	39±2
Sidra	Zumo	376±2	2757±92	2041±22
	Solución de FDS ^{c,d}	128±1	528±24	635±9
Bebida de cacao	Zumo	1114±21	1540±87	3622±26
	Solución de FDS ^{c,d}	49±9	1031±14	477±4
Bebida de Cola	Zumo	67±1	379±4	142±4
	Solución de FDS ^{c,d}	38±2	215±6	61±4
Bebida Isotonica	Zumo	23±0.7	147±7	356±23
	Solución de FDS ^{c,d}	2.4±0.2	17±1	nd
Refresco de Naranja	Zumo	150±5	1153±30	716±46
	Solución de FDS ^{c,d}	6.9±0.3	151±1	27±1
Agua tónica	Zumo	6.7±0.3	51±2	nd
	Solución de FDS ^{c,d}	5.1±0.2	44±1	nd

^a Fenoles expresados como mg. equivalentes de Ac. gálico/Litro de vino.

^b Capacidad antioxidante expresada en mmoles Trolox /Litro de vino

^c Solución de Fibra dietética soluble.

^d Compuestos Fenólicos asociados a la Fibra dietética soluble; determinados por método Folin-Ciocalteu

En el resto de refrescos los fenoles aparentemente determinados pueden considerarse interferencias producidas por diversos aditivos (debido a la pequeña concentración), o quizá error del mismo método; En el caso de la tónica pudiera ser la presencia de trazas de quinina.

En cuanto a sidra, horchata y bebida de cacao al no tener ningún tipo de relación entre sí, no se puede establecer ningún nexo entre ellas, tan solo destacar que al ser bebidas “naturales” la concentración de fenoles es mayor que en los refrescos, aunque ello no se observa en el porcentaje de asociados.

Si nos fijamos en la tabla 15, donde se muestra la composición fenólica de estas bebidas, determinada por CLAE, se observa la gran diferencia existente entre estas bebidas.

Tabla 15 Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos en otras bebidas

	COMPUESTOS FENÓLICOS ^b	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^a (%)			
		Ácidos Benzoicos	Ácidos Hidroxicinámicos	Flavonoides ^c	Antocianinas
Horchata	532±11	31±2	13±1	56±5	nd
Sidra	376±2	17±1	15±1	69±6	nd
Bebida de cacao	1114±21	5.3±0.4	3.3±0.2	91±7	0.79±0.06
Refresco de cola	67±1	61±5	39±3	nd	nd
Bebida Isotónica	23±0.7	65±3	24±2	12±1	nd
Refresco de Naranja	150±5	13±1	4±0.3	83±7	nd
Agua tónica	5.1±0.2	54±4	46±4	nd	nd

^a Polifenoles determinados por CLAE (Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

^b Polifenoles totales cuantificados por el método Folin Ciocalteu. Expresados como mg. equivalentes de Ác. gálico/Litro de bebida.

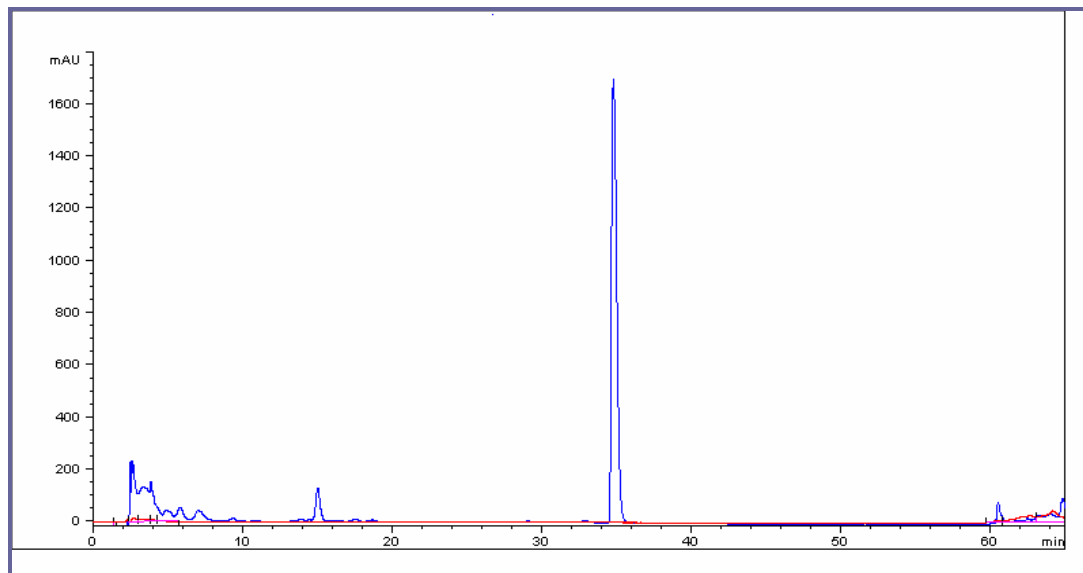
^c Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas,

Como es natural y se ha descrito en diversos trabajos los compuestos fenólicos mayoritarios en la semilla de cacao son flavonoides y antocianinas; y como se describe en la tabla parte de estos compuestos van a ser capaces de superar todos los tratamientos tecnológicos (a pesar de la especial sensibilidad de las antocianinas) y llegar a la bebida de cacao. Sin embargo en las bebidas refrescantes como bebida isotónica y tónica, los altos obtenidos por CLAE nos induce a pensar que realmente surgen interferencias por parte de los aditivos adicionados.

De nuevo, al igual que sucedía con los zumos y las infusiones se observó que la solución de FDS presentaba resultados positivos de actividad antioxidante, Folin-Ciocalteu y espectro de absorción,

mas al intentar la cuantificación mediante CLAE, no se obtenia señal (figura 21) Esto nos llevó de nuevo a la realización de una hidrólisis enzimática con celulasa

Figura 21. Cromatograma por CLAE de bebida de Cola vs Cromatograma de su FDS



En color azul se muestra el cromatograma de la coca cola y en color rosa el cromatograma de su FDS; ambos a $\lambda=280\text{nm}$

Los resultados obtenidos al realizar la hidrólisis con celulasas se muestran en la tabla 16

Tabla 16. Polifenoles asociados hidrolizados y capacidad antioxidante

Solución de FDS bebida Hidrolizado ^a	de de Compuestos Fenólicos Hidrolizados ^{a,b}	PRINCIPALES GRUPOS DE FENOLES (CLAE) ^{b,c} (%)				ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ^d	
		Acidos Benzoicos	Acidos Hidroxicinámicos	Flavonoides	Antocianinas	FRAP	ABTS
Horchata	253±2	29±2	12±1	59±5	nd	640±99	172±14
SIDRA	217±3	21±2	45±4	34±3	nd	593±26	711±18
Bebida de cacao	717±10	11±1	3.1±0.1	86±7	nd	1137±30	1491±7
Refresco de cola	57±2	49±3	nd	51±4	nd	364±7	114±2
Bebida Isotonica	18±1	25±2	nd	75±6	nd	112±2	115±11
Refresco naranja	122±3	16±1	10±1	74±6	nd	162±2	118±5
Agua tónica	4.0±0.2	19±2	nd	81±7	nd	nd	nd

^aDisolución de fibra dietética soluble (FDS) hidrolizada con celulasa

^c Polifenoles determinados por CLAE (Cromatografía líquida de alta eficacia) o HPLC. Agrupados en los 4 grupos más importantes expresados en porcentaje sobre el total de polifenoles cuantificados por HPLC.

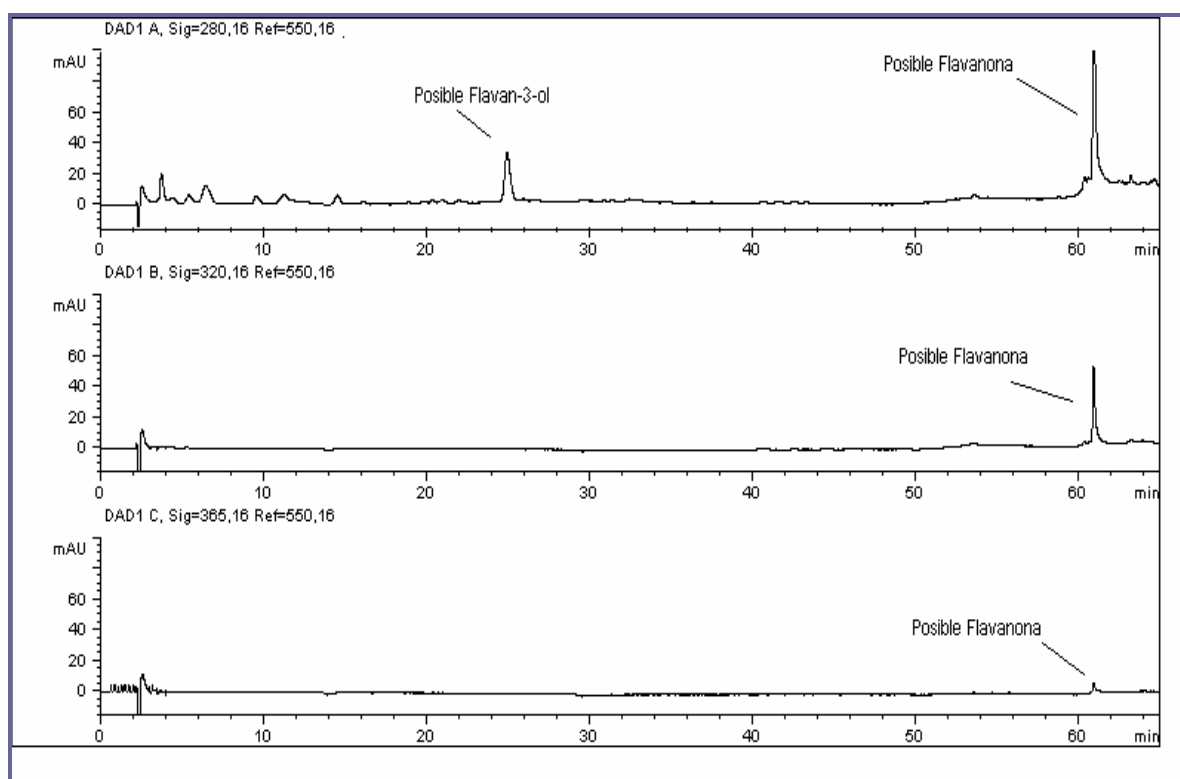
^b Polifenoles determinados en la disolución de fibra (FDS) hidrolizada con celulasa, por el método Folin iocalteau. (mg ac. gálico/Litro zumo)

^d Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas

De estos resultados mostrados en la tabla anterior se deduce que en la bebida de cacao la celulasa es capaz de liberar gran cantidad de compuestos fenólicos, principalmente fenoles de tipo ácido (más de l 90%).

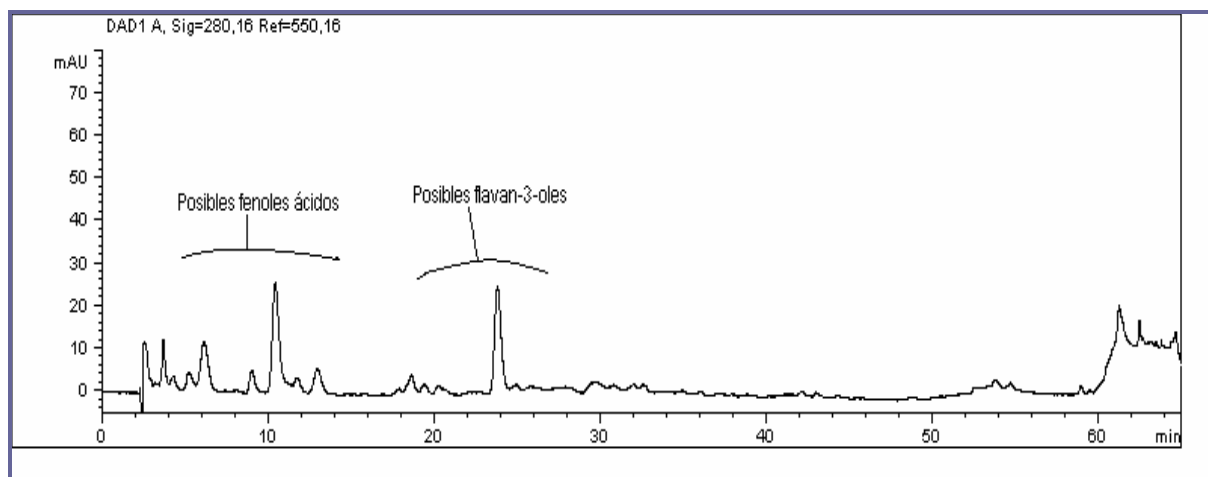
En el refresco de cola la liberación de compuestos fenólicos se ve reflejada en gran medida en el aumento de los ácidos hidroxicinámicos, mientras que en el refresco de naranja los fenoles que se liberan mas fácilmente son los flavonoides (flavanonas) (figura 22), fenoles de tipo neutro.

Figura 22. Cromatograma (CLAE) de la solución de FDS del refresco de naranja hidrolizada con celulasa, a diferentes longitudes de onda.



Por otra parte los resultados obtenidos en bebida isotónica y agua tónica, de nuevo deben ponerse en entredicho, puesto que probablemente sean aditivos con estructura fenólica y no fenoles propiamente dichos. En la figura 23 se muestra el cromatograma obtenido al analizar por CLAE la disolución de FDS hidrolizada enzimáticamente de la bebida isotónica; en esta figura se observa la clara presencia de estas estructuras fenólicas, son estructuras de tipo ácido (como algunos aditivos empleados como estabilizantes) y de tipo flavonoide (estabilizantes ó incluso edulcorantes)

Figura 23. Cromatograma (CLAE) de la solución de FDS de la bebida isotónica hidrolizada con celulasa, a longitud de onda de 280nm (donde absorben todos compuestos fenólicos).



La chufa, por otra parte es un tubérculo perteneciente a las Ciperáceas. En esta familia, se han identificado ácidos fenólicos unidos a las paredes celulares de dicho tubérculo (Barker y col 2000). En la piel del tubérculo predomina el ácido cumárico, mientras que en el tubérculo sin piel abundan el ácido ferúlico y otros ácidos benzoicos. Sin embargo durante el proceso de elaboración de la horchata es complicado extraer estos compuestos, puesto que no es un proceso de extracción demasiado agresivo, y luego el tratamiento térmico empleado para su conservación provoca la pérdida de los compuestos que se han podido extraer. Por lo que es normal que existan, pero también es normal su presencia en menores concentraciones delo que cabría esperar en el tubérculo o materia prima.

La extractabilidad de los ésteres fenólicos se ve influenciada probablemente por su accesibilidad y un pre-requisito importante es la co-extracción con otros componentes de la pared celular (en este caso por ejemplo los polisacáridos no digeribles de la FDS)

En general la hidrólisis enzimática con celulasa es capaz de romper algunos enlaces de los compuestos fenólicos en la FDS. En muchas ocasiones los compuestos fenólicos hidrolizados se encuentran en una concentración mayor que antes de sufrir la hidrólisis (fenoles asociados), este aumento puede explicarse porque el método Folin-Ciocalteu se basa en un mecanismo de oxidación del fenol (Singleton y Rossi. 1969); de esta manera puede ocurrir que la hidrólisis libere en ciertas ocasiones fenoles con más grupos OH (u otros) susceptibles de sufrir esta reacción, mientras que en otras bebidas no sucede esta fenómeno.

Las proteínas y sustancias proteicas son de gran importancia, en las frutas; de esta manera podemos distinguir al menos dos grandes tipos de compuestos proteicos: enzimas y glicoproteínas.

Las enzimas son las más importantes en las frutas. Enzimas como pectinmetilesterasa, que ejerce su acción sobre las sustancias pécticas durante la maduración de la fruta, y en ocasiones durante las primeras etapas del procesado para la obtención de zumo (cuando se produce ruptura de paredes celulares y se mejora el contacto entre pectinas y enzimas), o polifenoloxidasa que actúa sobre grupos fenoles oxidándolos (Goulao y Oliveira , 2007), o enzimas especiales y mas específicas de cada fruta como la bromelaina en la piña (enzima que actúa sobre otros péptidos y proteínas) .

Pero también sintetizan otras proteínas que inhiben la degradación de sus paredes celulares provocada por enzimas secretadas por patógenos (hongos u otros microorganismos), de éstas, las mas conocidas son las proteínas inhibidoras de poligalacturonasas, cuya función consiste en actuar formando complejos específicos y reversibles con poligalacturonasas microbianas.

Estas enzimas están y actúan en los frutos pero no es probable que lleguen al zumo, debido a la incompatibilidad entre sus específicas condiciones de pH y temperatura con las condiciones en las que se realiza el proceso de obtención del zumo.

Otra proteína muy importante en frutas y vegetales (en el reino vegetal en general) es la expansina, proteína de 25-27kDa, relacionada con el crecimiento de la pared celular (McQueen-Mason, Le, Brocklehurst, 2007). Es capaz de romper enlaces de ciertos polisacáridos para luego participar en su reorganización. También tiene parte activa durante el proceso de maduración de las frutas.

Los alérgenos de naturaleza proteica, son muy importantes en ciertos tipos de frutas, como en la manzana, melocotón, uva y tomate (Marzban y col 2005). Aun cuando llegasen intactos al zumo (debido a condiciones del procesado), no es probable que se cuantificaran entre las proteínas asociadas/ no digestibles, puesto que el método empleado para aislar la fibra (método que intenta simular lo más posible las condiciones fisiológicas), aplica unas condiciones que solo permitirían su cuantificación si estuviesen realmente asociados, y éste tipo de alérgenos no suelen tener parte glucídica (Marzban y col 2005).

Por otro lado otras proteínas que podemos encontrar en los zumos son las glicoproteínas, en forma de arabinogalactano proteínas. Los AGP se encuentran en mayor o menor proporción en los zumos, esta glicoproteína está incluida en un 10 % de proteína. Esta proteína suele ser rica principalmente en prolina, hidroxiprolina, alanina o glicina .(Ooesterveld, y col, 2002). Estas proteínas que encontramos en forma de AGP, van a formar parte de la fibra soluble, puesto que como se ha demostrado anteriormente los arabinogalactanos tipo I y II son polisacáridos no digeribles que forman parte de la fibra dietética soluble.

Tabla 17. Proteína no digerible y /o asociada en el complejo de fibra en zumos

Zumo	Proteína Soluble(g/L) ^a	Proteína no digestible(g/L) ^b	Digestibilidad (%)
Manzana	0.086±0.005	0.035±0.008	59±1
Naranja	0.33±0.02	0.099±0.001	70±2
Naranja natural	0.32±0.02	0.258±0.03	21±2
Naranja y soja	2.02±0.01	0.498±0.01	76±1
Piña	0.029±0.001	0.026±0.003	10±1
Melocoton	0.23±0.01	0.054±0.001	76±2
Piña y uva	0.099±0.003	0.079±0.001	20±1
Melocoton y Uva	0.43±0.003	0.201±0.009	53±1
Mosto	0.015±0.001	0.0045±0.0009	70±1
Z.Tomate	0.326±0.004	0.201±0.004	38±2

^a Determinada en el zumo y expresada en g/L de zumo.

^b Proteína determinada en el complejo de fibra dietética soluble. Expresada en g/L de zumo

El porcentaje de digestibilidad de la proteína de los zumos es muy variable (10%-76%). El zumo de naranja y soja es el zumo con mayor concentración de proteína (2.02 g/L) y mayor porcentaje de digestibilidad de dicha proteína. La soja es mundialmente conocida por su contenido en proteína (proteína de soja). La extractabilidad de la proteína de la soja depende de muchos factores; en cualquier caso el 90% de estas proteínas son globulinas (proteínas de almacenamiento) y el resto son enzimas, inhibidores proteicos, lipoproteínas de membrana (Martínez y col 2006)

Por otro lado los zumos con menor digestibilidad (y en consecuencia mayor porcentaje de proteína en la fibra dietética soluble) son los zumos de uva, zumo de piña y zumo de piña y uva. La piña posee en su composición un enzima específica (bromelaina) (Baldini y col. 1993), capaz de romper la proteína, pero esta enzima es muy lábil y se desactiva o desnaturaliza durante el procesado con lo que las proteínas (que sobreviven a tratamientos propios de la tecnología para elaborar el zumo) son capaces de llegar al zumo. Aunque las proteínas de la piña que sobreviven al procesado son muy pocas (zumo de piña y zumo de piña y uva son los que tienen menor concentración de proteína soluble). Por otra parte la extractabilidad de la proteína de la uva, es difícil si partimos de la base de que la uva en su origen tan solo tiene 1% s.s. de proteína, muy inferior a la encontrada normalmente en otras frutas (Vassilopoulou, 2007). De estas proteínas la mayoría se encuentran en forma libre (como LPT) y probablemente digestible., por ello el porcentaje de digestibilidad es tan elevado.

La digestibilidad y proteína asociada determinada en las infusiones se muestra en la tabla 18.

Empleando el método Bradford no se ha detectado proteína soluble en la infusión de Manzanilla, bien por el límite de detección, o por que los compuestos nitrogenados que pueda tener no se cuantifican como proteína, ó como ya describieron Izumi y col. (1996), las proteínas que tiene son liposolubles como la proteína P33, que realmente es una enzima con actividad proteasa.

Tabla 18. Proteína no digerible y /o asociada en el complejo de fibra en infusiones

Infusión	Proteína Soluble(g/L) ^a	Proteína no digestible(g/L) ^b	Digestibilidad (%)
Te Rojo	0.35±0.002	0.0048±0.0002	98±1
Poleo	0.39±0.01	0.0063±0.0004	98±2
Manzanilla	Nd ^c	nd	nd

^a Determinada en el zumo y expresada en g/L de zumo.

^b Proteína determinada en el complejo de fibra dietética soluble. Expresada en g/L de zumo

^c No detectado

La proteína soluble y la digestibilidad de la proteína en las infusiones de te y poleo son muy similares y muy elevadas (98%), pero totalmente diferentes a la infusión de manzanilla; esto se encuentra relacionado no solo con el tipo y género de planta, sino también con la parte de dicha planta empleada en la elaboración de la infusión.

Por otra parte la proteína no digerible determinada en la infusión de te es de suponer forme parte del denominado polisacárido conjugado del te, descrito por Izumi y col. (1996), que realmente es una glicoproteína, que según este trabajo se considera no digerible.

La concentración de proteína asociada en *refrescos y otras bebidas* (tabla 19) es algo más difícil de explicar.

En las bebidas refrescantes, es el agua tónica la bebida que presenta una mayor digestibilidad (100%), al no presentar proteína asociada. la proteína soluble probablemente sea algún aditivo de naturaleza proteica; O puesto que solo se han detectado trazas (0.78mg/L) simplemente a causa de algún tipo de contaminación ó formación de algún artefacto durante la determinación. Esto mismo cabría pensar en el caso de la bebida isotónica y en el caso de la bebida de cola, aunque en esta última exista presencia de nuez de cola.

El refresco de naranja es la bebida de este grupo con mayor cantidad de proteína soluble, pero menos digestibilidad, al igual que sucedía en el zumo de naranja natural. Sin embargo este valor no se corresponde con el 16% de zumo de naranja que el fabricante afirma, pero si podría ajustarse más si se tienen en cuenta la cantidad de aditivos y estabilizantes que tiene añadidos.

Tabla. 19 Proteína no digerible y /o asociada en el complejo de fibra en otras bebidas

Bebida	Proteína Soluble(g/L) ^a	Proteína no digestible(g/L) ^b	Digestibilidad (%)
Horchata	1.21±0.05	0.51±0.002	58±5
Sidra	0.078±0.0007	0.076±0.004	2.6±0.3
Bebida de cacao	2.7±0.08	2.6±0.02	3.7±0.3
Refresco de cola	0.023±0.0027	0.0021±0.0008	91±5
Bebida isotónica	0.081±0.005	0.023±0.0005	71±4
Refresco naranja	0.119±0.004	0.085±0.001	29±1
Agua tónica	0.00078±0.00003	Nd ^c	100±0.0003

^a Determinada en el zumo y expresada en g/L de zumo.

^b Proteína determinada en el complejo de fibra dietética soluble. Expresada en g/L de zumo

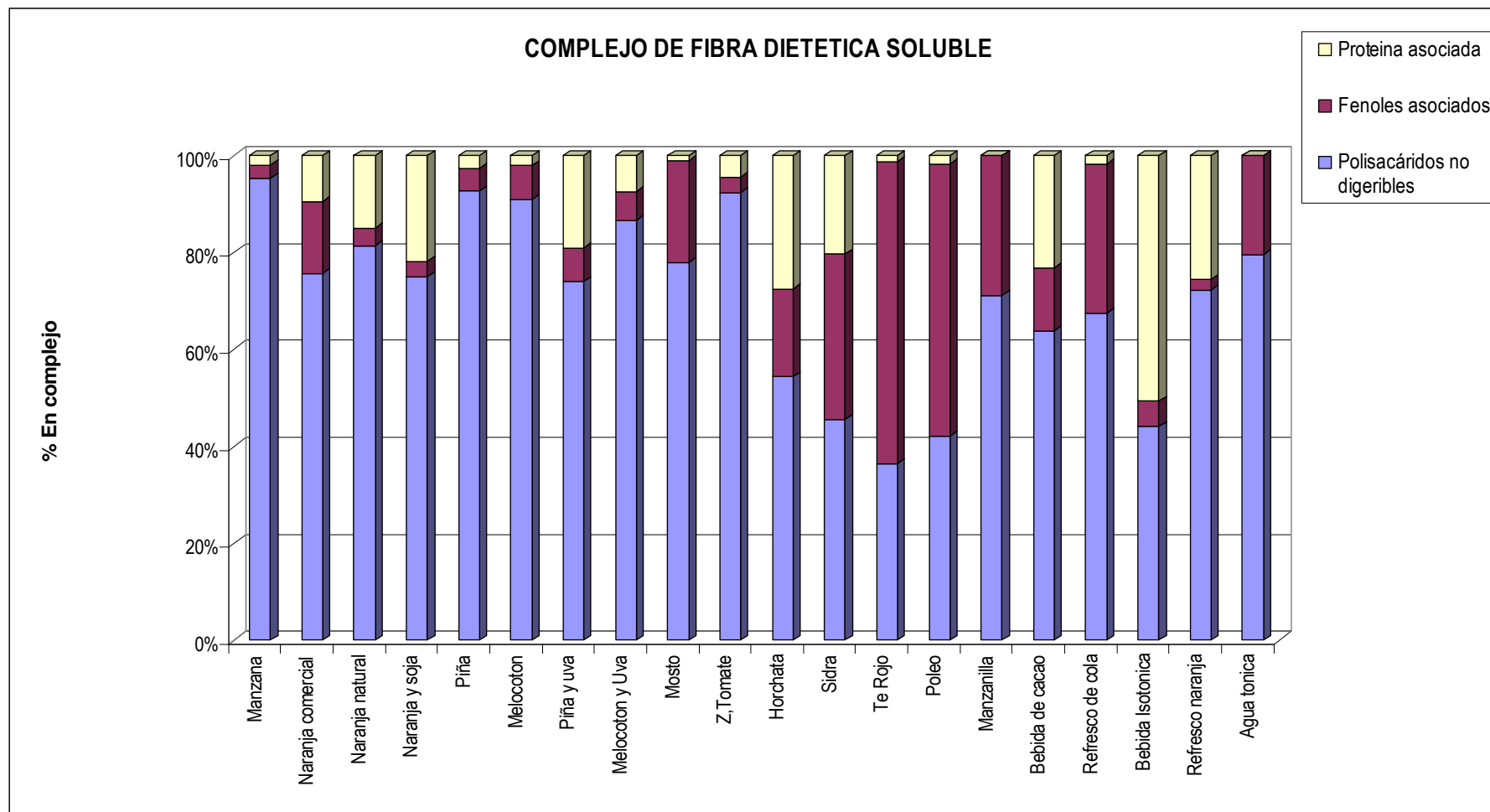
^c No detectado

La sidra es junto a la bebida de cacao las bebidas que presentan menor digestibilidad de proteína. Si los diferentes tipos de sidra tienen diferentes perfiles proteicos en función del proceso, el lagar y la variedad de manzana (Blanco-Gomis y col 2007), es natural que exista tanta diferencia entre la digestibilidad de la proteína entre la sidra (2,6%) y el zumo de manzana (59%). Por lo tanto es de esperara que también el porcentaje de glicoproteínas en la FDS sea mayor.

La bebida de cacao también posee un porcentaje extremadamente pequeño de proteína digestible. La semilla de cacao tiene un elevado porcentaje proteico, pero sufre grandes alteraciones durante la maduración, la fermentación, el tostado y todos los tratamientos posteriores a los que es sometido para obtener el cacao en polvo (Abecia-Soria y col 2005; Zak y Keeney 1976). La semilla de cacao tiene principalmente proteínas de almacenamiento (albúmina, globulinas, prolaminas y gluteninas), de las que solo la albúmina es totalmente soluble en agua y las globulinas parcialmente; sin embargo Voigt y col (1992) describieron la presencia de globulinas glicosiladas de elevado tamaño molecular en la semilla de cacao. Estas proteínas al ser solubles y glicosiladas podrían formar parte de la fibra. Aunque también se debe tener en cuenta que hablamos de bebida láctea de cacao, lo que implica la presencia de proteínas de la leche que pueden provocar interferencias o interaccionar y dar positivo en el ensayo de Bradford.

A la luz de todos estos datos podemos sugerir la presencia de un complejo de fibra dietética soluble (FDS), formado por polisacáridos no digeribles, compuestos fenólicos asociados y proteína asociada / no digerible (figura 25)

Figura 25. Composición del complejo de fibra dietética soluble de las bebidas



Tanto los compuestos fenólicos como la proteína asociada, se encuentran unidos de alguna manera (puentes de hidrógeno, interacciones, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes, o simple atropamiento en la “red “de fibra) a los polisacáridos de la fibra dietética solubles.

Del mismo modo en que las bebidas poseían diferentes concentraciones de polisacáridos no digerible ó fenoles ó proteína asociada, así sucede con el “complejo de FDS”. Existen grandes diferencias no solo entre los distintos grupos de bebidas, sino también dentro de cada grupo. La bebida con mayor porcentaje de fenoles asociados es la infusión de t e rojo (62%), lo que debería conferir una mayor actividad antioxidante a esta infusión, pero no sucede así, debido en gran parte al tipo de compuesto fenólico predominante en cada complejo, que como se ha descrito con anterioridad es diferente en cada grupo de bebidas y en muchas ocasiones diferente dentro del mismo grupo (como el caso del zumo de naranja y el zumo de piña).

En cualquier caso los compuestos fenólicos asociados van a conferir una serie de propiedades a la fibra dietética soluble, de las que carecen otras fibras (principalmente se creará cierto status antioxidante en le colon, beneficioso para el organismo).

En Resumen

La presencia de fibra dietética soluble en las bebidas en ciertas bebidas (zumo de melocotón, zumo de tomate, bebida láctea de cacao) es cuantitativamente importante y en otras cuanto menos interesante (bebida de cola, horchata). En los zumos se encuentran concentraciones de fibra dietética soluble (entendido como polisacáridos no digeribles) de 0.3- 4.1 g/L; En infusiones la concentración se sitúa en torno 0.08-0.15 g/L mientras que la bebida de cacao presenta valores de 7.17g/L...

Las pectinas y concretamente los arabinogalactanos son los principales constituyentes de estas fibra dietética soluble de las bebidas

Es destacable la diferencia significativa tanto en composición como en contenido de la infusión de manzanilla, frente a las otras infusiones analizadas. Aparentemente la parte de la planta empleada para obtener la infusión, podría ser la causa.

La fibra dietética en las bebidas, principalmente en los zumos, sidra, horchata, infusiones (y en menor medida en el resto) aparece como un complejo formado mayoritariamente por polisacáridos no digeribles, junto por polifenoles asociados y proteína no digerible (depende de la bebida).

El complejo de FDS que presenta un mayor porcentaje de polifenoles es el determinado en el té rojo (63%), mientras que el zumo de manzana mostró un mayor porcentaje de polisacáridos no digeribles (95%) formando parte del complejo.

*FERMENTACIÓN COLÓNICA in vitro DEL COMPLEJO DE FIBRA EN
CIERTAS BEBIDAS*

I. ANTECEDENTES.

Los componentes de la dieta no digeridos por las enzimas intestinales, ó digeridos pero no absorbidos en el intestino delgado, pueden ser metabolizados por las bacterias del intestino grueso mediante un proceso anaerobio denominado fermentación colónica (Goñi y Marti-Carron, 2001).

Durante la fermentación colónica una gran variedad de sustratos estan involucrados y muchos de los compuestos bioactivos presentes en la matriz alimentaria son liberados, para posteriormenlye ser absorbidos a través del lumen colónico ó metabolizados por la microflora colónica a otros productos de fermentación.

El colon humano es un complicado ecosistema bacteriano. La microflora intestinal esta constituida por mas de 500 especies bacterianas diferentes de las que el 99% son anerobias (Tuohy y col, 2006;Macfarlane y Macfarlane, 1997; Louis y col. 2007), obteniendo su energia principalmente, a través del proceso de fermentación. Gran parte de estas bacterias pueden degradar la fibra, si bien, por lo general, una determinada especie sólo consigue realizar un paso dentro del proceso, siendo necesario un amplio espectro bacteriano para completar la fermentación. Los productos que se forman finalmente y sus cantidades y relaciones dependen, por un lado, del tipo de fibra y, por otro, de la composición de la flora bacteriana

Al producirse la fermentación, la flora intestinal anaerobia presente en el colon utiliza la fibra dietética y el almidón resistente para su propia nutrición y crecimiento. Esto aumenta de forma muy considerable la masa bacteriana; de ahí que, con un sustrato adecuado, las bacterias lleguen a representar hasta un tercio del peso de las heces. Este constituye uno de los mecanismos que hacen a la fibra aumentar el volumen de las heces de manera considerable.

El colon proximal es la zona donde se produce mayoritariamente la fermentación de los hidratos de carbono; al ir avanzando el bolo alimenticio por el colon, la biodisponibilidad de los carbohidratos disminuye y la proteina comienza a ser fermentada en la zona más distal del colon (Mcfarlane , Gibson Cummings, 1992)

De la naturaleza del sustrato dependerán los tipos de bacterias que se desarrollarán. La alteraciones en la dieta producen cambios cualitativos y cuantitativos en los sustratos susceptibles de ser fermentados, provocando cambios en flora microbiana y en su metabolismo. Cada sustrato conduce al crecimiento parcial de una especie bacteriana, aprovechándose sólo aquellas que fermentan sobre la base de ese sustrato. Es también conocido que una dieta pobre en fibra puede producir cambios en la ecología de la flora intestinal y convertir los lactobacillus, habituales en el colon, en bacteroides capaces

de desdoblar los ácidos biliares en compuestos cancerígenos, como el deshidronorcoleno y el metilcolantreno (Kawata, y col. 1992 ; Baral y Maity, 1992; Florent y col 1985)

La microbiota intestinal está influenciada, finalmente por otros factores tales como el pH, la concentración de oxígeno, la concentración de hidrógeno del medio, la concentración de metabolitos, el tiempo de tránsito intestinal (no es el mismo para fibra soluble que insoluble), los propios metabolitos generados por las bacterias mismas.

Principales sustratos fermentables

Los componentes de la dieta que escapan a la digestión pueden ser sustratos susceptibles de sufrir el proceso de fermentación llegar al intestino grueso. Los carbohidratos “no digeribles” incluyen almidón resistente, oligosacáridos y polisacáridos de la pared celular; también ciertas proteínas y compuestos de naturaleza proteica pueden alcanzar el colon, mientras que secreciones endógenas como mucina provee de sustratos no dependientes de la dieta ; muchos metabolitos secundarios de las plantas ingeridos con la dieta, como sustancias fenólicas pueden también llegar intactos al colon y sufrir el proceso de fermentación.

Los principales sustratos útiles para el crecimiento bacteriano, son los **carbohidratos de la dieta**. Gran parte de estos carbohidratos consisten en almidón resistente (McFarlane y Englyst. 1986); el resto de los carbohidratos que llegan al colon está formado principalmente por polisacáridos no amiláceos, azúcares no absorbidos (rafinosa, estaquiosa, lactosa) y otros oligosacáridos como fructooligosacáridos, xilooligosacáridos, galactooligosacáridos. Estos oligosacáridos no digeribles tienen diferente grado de fermentabilidad y las diferentes especies muestran diferentes preferencias glicosídicas (Vulevic, Rastall, Gibson, 2004). Los polisacáridos diferentes del almidón incluyen: pectinas, arabinogalactanos, gomas, hemicelulosas, que son rápidamente fermentadas por microbiota colonica, mientras que la lignina y la celulosa son menos fermentables.

Los carbohidratos en el colon son fermentados a ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, así como otros metabolitos (lactato, piruvato, enol., succinato) y gases (hidrógeno, dióxido de carbono y ácido sulfhídrico).

En general los componentes de la pared celular que llegan intactos al colon son: celulosa, arabinoxilanos, xiloglucanos, β -glucanos, mananos, pectinas, ligninas. Estos polímeros se encuentran asociados a la pared celular y sufren degradación por parte de multitud de enzimas microbianas, como hidrolasas, esterasas, liasas.

Sin embargo la degradación microbiana de lignina y celulosa (fibra dietética insoluble) resulta incompleta, generándose partículas que persisten a lo largo de la parte distal del colon, mientras que hemicelulosas y pectinas (fibra dietética soluble) son fermentadas en mayor medida por las bacterias del intestino grueso.

Los *arabinoxilanos* pueden ser degradados por diversas enzimas microbianas, como xilanasas. Estas enzimas actúan sinérgicamente con esterasas que son capaces de liberar el ácido ferúlico haciendo que los arabinoxilanos sean más accesibles para las bacterias.(Vardakou y col 2007). También influye el tamaño molecular, Hughes y colaboradores ya demostraron como fracciones de arabinoxilanos de diferentes tamaños moleculares fermentaban de manera diferente, todas las fracciones fermentaban de manera similar excepto la fracción de menor tamaño(66kDa) que mostró una selectividad especial para lactobacilos.

Los efectos fisiológicos de *las pectinas* están íntimamente relacionados con la forma y tamaño de la molécula. Generalmente no sufren despolimerización por enzimas intestinales, sin embargo una degradación parcial puede tener lugar en el estómago y en intestino delgado bajo determinadas condiciones fisicoquímicas. Las pectinas son fermentadas en mayor o menor grado por la microflora colónica (Dongowski y col. 2002);, este proceso de degradación consta de varias etapas: despolimerización y formación de oligómeros y ácido galacturónico, fermentación de estos monómeros por diferentes vías (Macfarlane y Gibson 1995; Macfarlane y Gibson, 1994) y formación de AGCC así como otros gases y productos. La principal enzima microbiana implicada en todo este proceso es la pectin liasa.

Para poder ser absorbida, la pectina debe ser degradada a ácido galacturónico o sus oligómeros (con menor grado de polimerización).

Por otra parte el grado de metilación también es determinante, las pectinas de bajo metóxilo fermentan más rápido que las pectinas de alto metóxilo ((Dongowski y col. 2002).

Las proteínas y aminoácidos también son sustratos disponibles para la fermentación bacteriana en el colon. Se produce mayoritariamente en la zona más distal del colon, originándose productos de fermentación muy diferentes a los que se producen con la fermentación de los hidratos de carbono. Cuando hay una gran cantidad de hidratos de carbono, la fermentación de proteínas se reduce, utilizándose la mayor parte de ellas en la síntesis de biomasa bacteriana, sin embargo si hay pocos carbohidratos la proteólisis se vuelve dominante.

Aproximadamente 13 g de proteína dietaria entra al colon diariamente, aunque otras fuentes de proteína en el colon son proteínas endógenas que incluyen secreciones bacterianas como enzimas, productos de lisis bacteriana y mucinas. (Wrong, 1998, Cummings y col., 1989).

Poco se sabe acerca de las bacterias responsables de la fermentación de aminoácidos, pero ciertos *Bacteroides* spp. *Eubacterium* spp. *Peptococcus* spp. y *Clostridia* producen enzimas proteolíticas (McFarlane y col. 1988). La proteína que llega al colon es fermentada a AGCC, isobutirato, isovalerico, compuestos nitrogenados, y finalmente amoníaco. Algunos de estos productos pueden ser tóxicos (Matsui, y col. 1995); un aumento de la proteína en la dieta aunque sea proteína fácilmente digestible, puede generar un aumento de metabolitos bacterianos tóxicos (Geypens y col. 1997; Evenepoel y col. 1999).

La fermentación de carbohidratos es energéticamente más favorable que la fermentación de aminoácidos y ocurre fundamentalmente en el colon proximal. El colon distal es un ambiente más proteolítico, donde las bacterias obtienen su energía mayoritariamente de la fermentación de aminoácidos.

Los dos factores fundamentales que influyen en la cantidad de proteína que alcanza el colon son la cantidad de proteína total ingerida en la dieta y la digestibilidad de esta proteína. Del mismo modo es importante tener en cuenta que la estructura química de la proteína sufre modificaciones por el procesamiento, especialmente por tratamientos químicos, generándose alteraciones en estructura que afectan a la susceptibilidad de sufrir ataques por enzimas proteolíticas.

En cuanto a fermentabilidad de **compuestos fenólicos**, los más estudiados son los flavonoides. Los flavonoides son sustratos para varias enzimas localizadas en el colon así como en el metabolismo hepático; de este modo la metabolización de los flavonoides se puede resumir en dos fases, la fase I donde ciertas enzimas (citocromo P450, glucosidasas) hidrolizan y oxidan estos compuestos y la fase II del metabolismo en la que se producen reacciones de conjugación y detoxificación. Sin embargo diversos estudios han demostrado que gran cantidad de los flavonoides ingeridos en la dieta llegan al intestino delgado sin sufrir ningún tipo de degradación hasta alcanzar el colon donde se ven sometidos a diversas biotransformaciones mediadas por enzimas procedentes de la microflora colónica, transformándose normalmente en fenoles simples. (Rechner y col. 2004)

El colon y la microflora allí presente es el lugar con mayor actividad metabólica para la liberación de ácidos hidroxicinámicos y agliconas flavonoideas. La degradación colónica de los flavan-3-oles (catequinas, epicatequinas,) ha sido investigada en profundidad, revelando que aunque no se produce liberación del anillo C, se abre generándose otros compuestos, como difenilpropan-2-ol.

Los oligómeros de procianidinas (desde trímeros hasta decámeros) parecen ser inestables al interactuar con el jugo gástrico *ex vivo*, y se descomponen esencialmente a monómeros de epicatequina y unidades diméricas u oligoméricas (Spencer y col., 2000). Esto sugiere que a pesar que los oligómeros de procianidinas no son absorbidos por los enterocitos en el intestino delgado como tales, pueden liberar grandes cantidades de epicatequina que pueden ser posteriormente absorbidas. Estas observaciones pueden tener importantes implicaciones acerca del efecto del consumo de procianidinas *in vivo*.

En definitiva, aunque los flavonoides y sus glicósidos pueden ser absorbidos a lo largo del tracto gastrointestinal, su absorción es incompleta y los niveles en circulación bajos (Manach y Donovan 2004, Scalbert y col. 2002). En consecuencia una cantidad importante de compuestos fenólicos van a llegar intactos al colon, influyendo positivamente en el mantenimiento de la salud intestinal. Esto corrobora las evidencias epidemiológicas que indican que dietas ricas en frutas y vegetales están asociadas con un descenso en el riesgo de problemas gástricos, diversos tipos de cáncer.

Productos de fermentación y principales efectos fisiológicos

En el proceso de fermentación de la fibra se producen, principalmente:

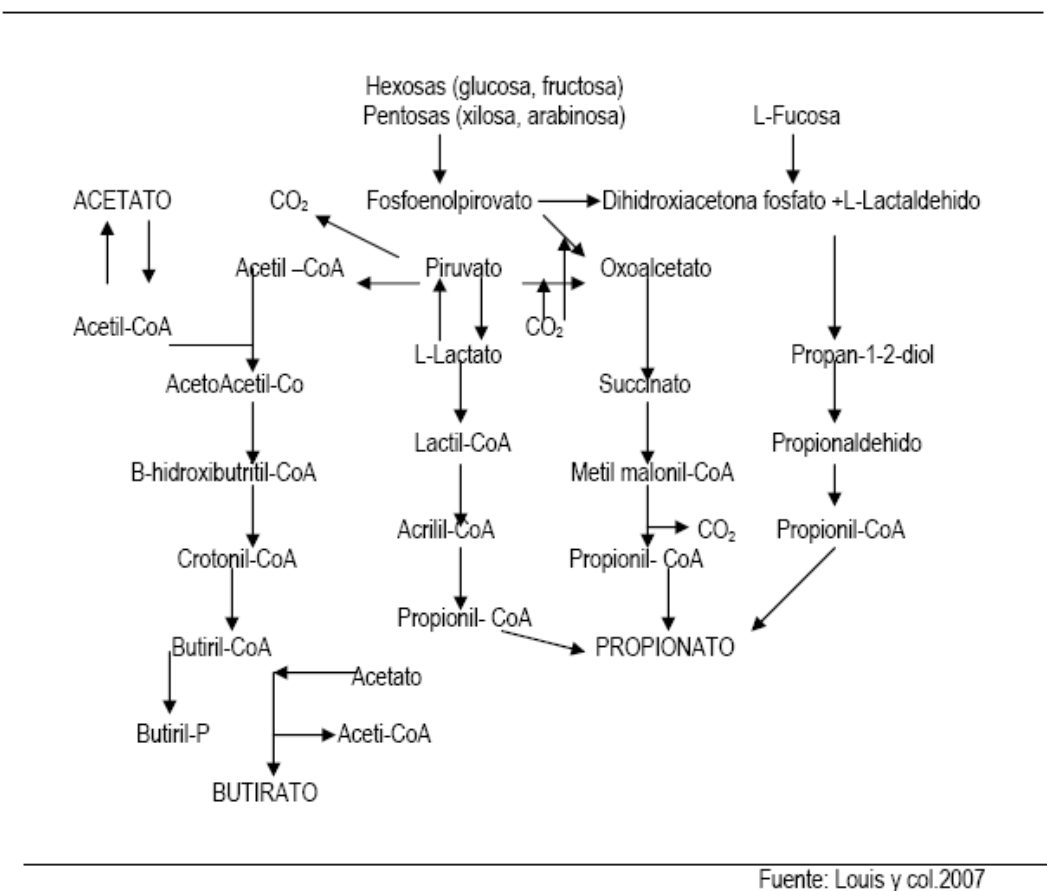
1. Ácidos grasos de cadena corta (AGCC).
2. Pequeñas proporciones de otros ácidos orgánicos: isobutírico, isovalérico, valérico, láctico, succínico)
3. Gases: dióxido de carbono (CO₂), hidrógeno (H₂) y metano (CH₄).
4. ATP, agua
5. Aumento de número total de bacterias. Este incremento se considera como un producto de fermentación, del que depende gran número de reacciones metabólicas.

Los gases generados (dióxido de carbono, hidrógeno y metano), en su mayor parte, son absorbidos por la mucosa intestinal y eliminados posteriormente con la respiración. Sólo una pequeña parte es expulsada a través del tubo digestivo.

Los AGCC que se forman con la fermentación son ácidos grasos volátiles (las principales rutas fermentativas empleadas por la flora colónica se observan la figura 1), y el 85% de ellos formados por: acetato, propionato y butirato, en una proporción ideal de 60:25:15, respectivamente; aunque la proporción real depende de diversos factores, como la dieta. Un efecto conocido derivado de la ingesta de carbohidratos no digeribles fermentables es una disminución del pH en el colon proximal debido a un aumento en la concentración de AAGCC. En la tabla 1 se muestra la producción de ácidos grasos de cadena corta generada por diversos sustratos

Inicialmente se pensó que los AGCC producidos durante la fermentación, mediante ósmosis, hacían pasar agua a la luz intestinal y que ésta era una de las causas que producía las diarreas por absorción deficiente de carbohidratos. Posteriormente se comprobó que estos AGCC, en su mayor parte se absorben rápidamente y desaparecen de la luz intestinal, produciendo un aumento de la absorción de sodio y agua (Cummings.1984; McNeill, Cummings y James, 1978, Louis y col.2007). Diversos estudios ya han aportado datos que sugieren que, además de la difusión pasiva de los AGCC, existe un transporte activo que va unido a una absorción de sodio y agua, de manera que con cada 10 mmol de AGCC se absorben alrededor de 40 mmol de sodio y 360 ml de agua (Sellin y Desoigme 1990.).

Figura 1. Principales rutas fermentativas.



Los AAGGCC producidos pueden tener un efecto local en el propio intestino, o bien ser absorbidos y metabolizados. El 90-95% de los AAGGCC producidos se absorben aunque no se conocen con exactitud los mecanismos.

De los tres AAGGCC absorbidos, principalmente el acetato y el propionato son los que pasan a la circulación portal, mientras que casi todo el butirato se oxida en el colonocito. Acetico y propionico llegan al hígado a través de la vena porta, donde su concentración es 4-10 veces más alta que en la

circulación sistémica.(Cummings y col. 1987) Del butirato producido en el colon, sólo una pequeña parte no se oxida en el colonocito y llega al hígado, donde se metaboliza formando sustratos energéticos como el glutamato o la glutamina.

Por otra parte, tanto el acetato como el propionato son empleados por el organismo como sustrato energético, pero mientras el propionato es utilizado principalmente por el hígado en la gluconeogénesis (Vogt y col. 2004), el acetato se utiliza en la lipogénesis(Edwards C y col. 1994) y es el único que llega a los tejidos periféricos, principalmente el muscular, donde es metabolizado (Skutches Holryde y Myers 1979). El uso del acetato en la lipogénesis es la causa de que productos como la lactulosa y el lactitol, que al fermentar producen gran cantidad de acetato, cuando se toman de manera crónica puedan producir elevaciones en los niveles sanguíneos de colesterol. (Jenkins . 1995).

Es sabido que la nutrición de la mayoría de las células de nuestro organismo se produce mediante el oxígeno y los nutrientes que le llegan a través de la sangre. Sin embargo, la nutrición de los colonocitos no sigue esta regla general, sino que la mayor parte de su nutrición se produce desde la luz intestinal, siendo el butirato quien aporta el 75% del oxígeno que necesitan (Ardawi y Newsholme ,1985; Pride y col 2002) De los AGCC que se forman con la fermentación de la fibra, el orden de preferencia, en su utilización por parte del colonocito, es: butirato, acetato y propionato (Cummings 1985; Roediger WE. 1982), aunque, como hemos visto, es la oxidación del butirato la que aporta la mayor parte de la energía. Por otro lado, no todo el colon se comporta de igual manera en la utilización del butirato, ya que el colon distal es el que presenta mayor dependencia de éste para obtener su energía (Pride y col 2002)

Tabla 1.Fermentabilidad de diversas fuentes de fibradietética

Tipo de Fibra Dietética	Fermentabilidad (%)	Acido Acético	Acido Propionico	Acido Butírico
Lactulosa	100	81	12	7
β-glucanos	100	67	15	15
Arabinogalactanos	65	68	24	8
Goma Guar	71	52	34	14
Goma Arábica	77	66	21	13
Pectina de Cítricos	93	90	7	3
Inulina	97	72	19	8
Oligofructosa	88	78	14	8
Salvado de trigo	25	61	13	26
Avena	57	59	19	22
Soja	58	62	20	18

Fuente: Saura-Calixto y col. 2002

Debido a las numerosas especies bacterianas que forman parte de la flora colónica, es indispensable aportar un sustrato complejo de fibra (soluble e insoluble), con el objeto de que todas las

especies puedan desarrollarse con normalidad y que su proceso fermentativo se realice a lo largo de todo el colon y no sólo en su porción más proximal; también de esta manera la proporción molar de ácidos grasos será más cercana a la ideal. En la tabla 1 se observa la producción de AAGCC de diversos sustratos, como se deduce de esta tabla, cuando se emplea soja como sustrato, la proporción molar es más cercana al ideal, que cuando se fermentan sustratos menos complejos.

En capítulos anteriores se ha demostrado la existencia no solo de fibra dietética soluble en las bebidas, sino la presencia de un complejo de fibra dietética soluble formado por los polisacáridos no digeribles, compuestos fenólicos asociados a estos polisacáridos y proteína resistentes a la digestión. Es decir un sustrato verdaderamente complejo susceptible de ser fermentado.

El complejo de fibra dietética llegará al colon donde sufrirá una serie de transformaciones y reacciones derivadas del proceso de fermentación colónica; de esta manera se formarán nuevos compuestos a la vez que desaparecerán otros, pero todos tendrán algún efecto fisiológico.

Los objetivos principales de este capítulo podrían resumirse, por tanto en:

Demostrar como el complejo de fibra dietética aislado en las bebidas (tanto alcohólicas, como sin alcohol) es sustrato susceptible de fermentar.

Determinar la influencia de los compuestos fenólicos asociados sobre la fermentabilidad del complejo de fibra, así como el propio comportamiento de estos fenoles durante la fermentación.

Aun no siendo un objetivo prioritario, en última instancia se comparará el efecto de la hidrólisis enzimática con celulasa (enzima no presente en el organismo humano) con la hidrólisis realizada por microbiota intestinal.

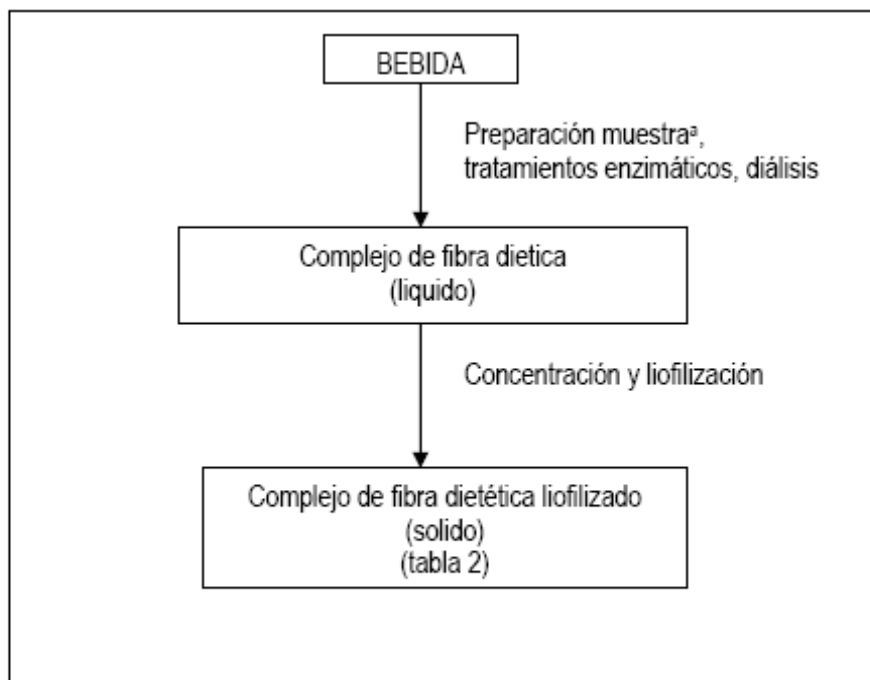
II. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES.

Las muestras fermentadas han sido elegidas como representantes de los 3 grandes grupos de bebidas “naturales” más consumidas en España: bebidas alcohólicas (vino tinto), infusiones (café), zumos (zumo de naranja).

El método de fermentación colónica *in Vitro* se realiza de manera óptima empleando sustratos sólidos, por lo que se hizo necesario aislar el complejo de fibra dietética, para una posterior liofilización (figura 2). Finalmente el complejo liofilizado es empleado como sustrato en la fermentación.

Figura 2.. Obtención del complejo de fibra sólido



^a Preparación de la muestra incluye, concentración (vino, zumo), o preparar el café

Las muestras fermentadas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Muestras fermentadas

Bebida ^a	Complejo de FDS liofilizado (g) ^b	Complejo de FDS espectrofotométricamente ^{c,d}
Vino Tinto	2.96	2.59
Infusión de Café	9.35	9.04
Z. Naranja Comercial	1.21	1.04

^a Las características de las bebidas aparecen en los capítulos correspondientes

^b Cantidad expresada si el volumen de complejo de FDS liofilizado fuese un Litro

^c Expresado como la suma de los polisacáridos no digeribles+ compuestos fenólicos asociados+ proteína resistente. Como g/Litro

2. REACTIVOS ESPECIFICOS DE FERMENTACIÓN.

Bicarbonato Amónico (131116, Panreac); Bicarbonato Sódico (141683, Panreac); Sodio Fosfato dibásico anhidro (131679, Panreac); Fosfato de Potasio monobásico (141509, Panreac) ; Magnesio

Sulfato 7-hidrato (131404, Panreac); Cloruro Cálcico anhidro (141219, Panreac); Cloruro de Manganese II 4-hidrato (131410, Panreac); Cloruro de Cobalto II 6-hidrato (131257, Panreac); Cloruro de Hierro III 6-hidrato (141385, Panreac); Hidrocloruro de L-cisteína (C-1276, Sigma); Sodio Sulfuro 9-hidrato (211682, Panreac); Hidróxido Sódico (141687, Panreac); Resarzurina (171591, Panreac); Triptona (2340, Biolife).

Reactivos para la determinación de ácidos grasos de cadena corta, producidos durante la fermentación: Acido Acético Glacial (63.1000, Merck); Acido Propiónico (800605, Merck); Acido Isobutírico (800472, Merck); Acido Butírico (800457, Merck); Acido Isovalérico (800820, Merck); Acido Valérico (800821, Merck); Acido 4-metil-valérico (27782-7, Aldrich); Acido Fórmico (2640100, Merck).

3. EQUIPOS y OTROS MATERIALES.

Bolsas Stomacher 80 (Seward Medical).

Tela Dacron diámetro de poro 150µm.

Cromatógrafo Hewlett Packard-5890, con detector de ionización de llama, autoinyector, automuestreador, integrador, HP-3390 A. Columna semicapilar, con fase estacionaria polar HP-FFAP (10m x 0.53mm di) (19095F-121, Hewlett Packard). (para la determinación de AAGGCC)

Autoclave de alta presión (Berthod).

Stomacher 80, (lab. Blender, Seward Medical).

Liofilizador (Virtis,)

4. BREVE DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.

La evaluación de la fermentación colónica in vivo en humanos es una tarea realmente complicada debido a que este proceso suele producirse mayoritariamente en el colon proximal, una zona de difícil acceso; sin embargo se ha demostrado que los estudios in Vitro son una herramienta válida en el análisis de la fermentación colónica. Tan solo es necesario tener en cuenta ciertos parámetros: la composición química del sustrato, tipo de flora y tasa de crecimiento y tiempo de incubación (Mcfarlane y Mcfarlane, 1993).

El método empleado en este capítulo es el descrito por Goñi y Martín –Carrón (1998, 2001). Este método ampliamente usado, es una herramienta totalmente válida al cumplir con creces, los requisitos descritos anteriormente.

De este modo la técnica (ampliamente descrita en el capítulo 2), consiste en la suspensión del sustrato (complejo de fibra dietética) en una solución nutritiva que aporta las sustancias necesarias para

el crecimiento y mantenimiento bacteriano, seguido de su inoculación con el homogeneizado de los contenidos fecales de ratas Wistar.

El medio de fermentación, el sustrato y el inóculo se incuban en condiciones estrictas de anaerobiosis durante 24 horas, para finalmente detener el proceso mediante una bajada brusca de la temperatura (parada por frío), obteniendo un sobrenadante y un residuo no fermentado.

En el medio resultante se realizan todas las determinaciones necesarias para desarrollar los objetivos descritos anteriormente.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. FERMENTABILIDAD DEL COMPLEJO DE FIBRA DIETÉTICA.

La fermentabilidad puede determinarse de diversas maneras, en este caso, se ha determinado considerando la producción de AGCC, considerando lactulosa como patrón totalmente fermentable (tabla 3)

Tabla 3. Fermentación *in vitro* del complejo de fibra dietética del vino tinto, café soluble y zumo de naranja comercial. Producción de Ácidos grasos de cadena corta y porcentaje de fermentabilidad

Bebida	Producción AAGGCC ^a		Relación molar de AAGGCC(%)			Fermentabilidad ^b (%) de	
	mmol/ L bebida	mmol/ gsustrato ^c	Acetico	Propionico	Butirico	Complejo ^d	PS no digeribles
Vino Tinto	4.6±0.2	1.6±0.1	52	35	13	21.3	37.8
Café	37.9±1.4	4.2±0.3	59	30	11	55.1	74.9
Z. Naranja	4.5±0.3	4.3±0.2	52	34	14	53.8	73.2

^a Ácidos grasos de cadena corta

^b Fermentabilidad frente a patrón totalmente fermentable (lactulosa).
Fermentabilidad (%) = (AAGGCC Muestra / AAGGCC Lactulosa) * 100.

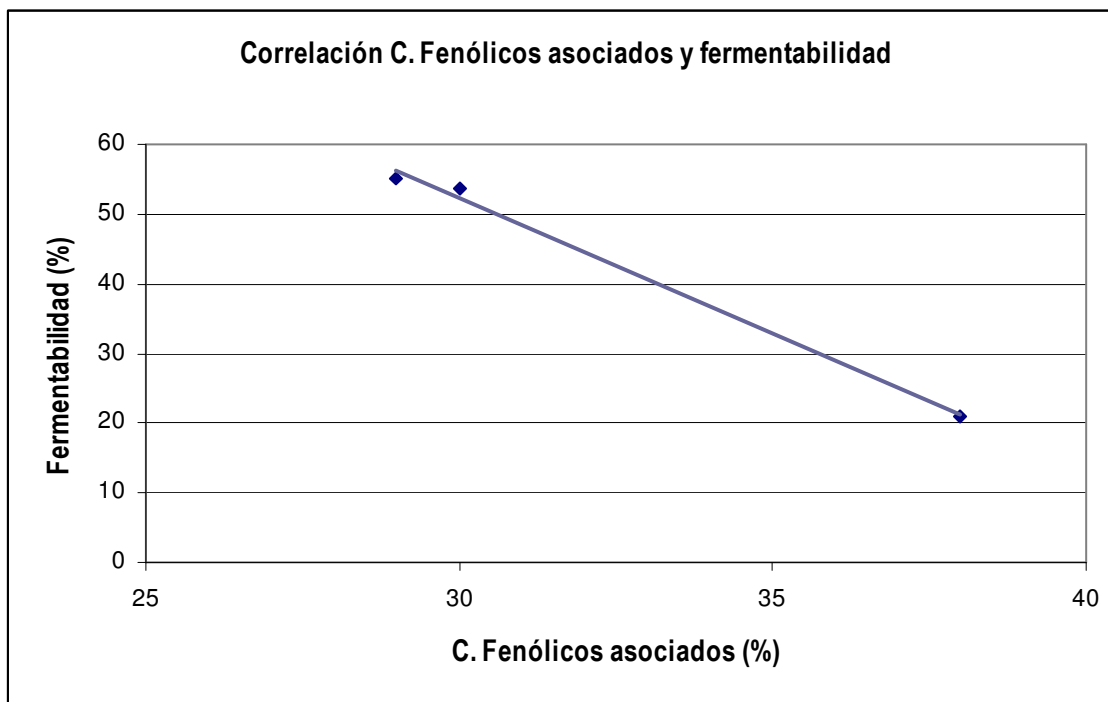
^c Sustrato = complejo de fibra dietética

^d Complejo de fibra = polisacáridos no digeribles-polifenoles-proteína

La fibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles solubles no amiláceos) es el componente mayoritario del complejo, luego es de esperar una elevada fermentabilidad, cercana a los valores determinados para fibras solubles (pectinas, gomas); sin embargo la bebida con un mayor porcentaje de fermentabilidad es la infusión de café con 55.1 %, muy lejos de los valores que se obtienen para pectinas puras (70-75%). (Barry y col. 1995).

Estos valores tampoco se corresponde con los valores de fibra dietética soluble de las muestras, aunque si se encuentra correlacion entre la fermentabilidad y los compuestos fenólicos asociados al complejo (figura 3). Al aumentar el porcentaje de compuestos fenólicos asociados, disminuye la fermentabilidad del complejo (coeficiente de correlación de -0.997)

Figura 3. Correlación Compuestos fenólicos asociados y fermentabilidad del complejo



Esta correlación parece indicar que la presencia de estos compuestos fenólicos no permite la acción (íntegra) de la flora microbiana. (Saulnier y col. 1999, Saulnier y col. 2001; Eraso y Hartley, 1990; Rechner y col. 2004).

Los 3 sustratos presentan prporciones molares de AAGGCC similares, siendo el ácido acetico el mayoritario (52-59%). Los polisacáridos principales presentes en estos sustratos son sustancias pécticas y hemicelulosas solubles, que incluyen elevadas concentraciones de ácidos urónicos en su composición, los cuales generan ácido acético durante la fermentación (Barry y col. 1995).

Por otra parte es interesante subrayar las elevadas concentraciones de acido propionico (30-35%), porcentaje similar al producido por goma guar (29%), ó β -glucanos (31%) (Goñi y Martin-Carrón, 1998). Diversas investigaciones han demostrado la influencia del propiónico, sobre la síntesis de colesterol en hepatocitos mediada por la enzima HMG-CoA reductasa (Illman y col. 1991; Illman y col. 1988).

El café presenta mejores valores globales de fermentabilidad, tanto en cuanto a concentración de AAGGCC (38 mmol/Litro Bebida), como perfil de AAGGCC (59:30:11). Una elevada concentración de AAGGCC está asociada con un menor valor de pH en el colon. Esta acidificación del ecosistema colónico previene el desarrollo en demasía de bacterias patógenas sensibles a estos cambios de pH (Topping y Clifton, 2001)

2. FERMENTABILIDAD DE LOS POLISACÁRIDOS DEL COMPLEJO DE FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE.

Una vez determinada la fermentabilidad del complejo como un conjunto, el siguiente paso a seguir consistió en determinar la fermentabilidad de los polisacáridos no digeribles, diferentes de almidón, constituyentes principales de este complejo (tabla 4)

Tabla 4. Fermentación *in vitro* del complejo de fibra dietética^a del vino tinto, café soluble y zumo de naranja comercial. Polisacáridos no digeribles, no fermentados.

Bebida	Complejo de fibra dietética (g/L)	de Polisacáridos en el complejo (g/L)	Polisacáridos del complejo no fermentados (g/L)
Vino Tinto	2.72± 0.11	1.53±0.09	0.594±0.03
Café	9.10±0.61	7.53± 0.5	1.08±0.09
Z. Naranja	1.04±0.09	0.79±0.05	0.057±0.003

^a Complejo de fibra dietética soluble = polisacáridos no digeribles+compuestos fenólicos asociados y proteína resistente.

De los datos de la tabla 4, podemos deducir que el 39% de los polisacáridos presentes en el complejo de Fibra dietética del vino tinto, no fermentan; éste sustrato no sólo tenía el menor porcentaje de fermentabilidad (21%), sino que este valor se corresponde con el mayor porcentaje de compuestos fenólicos asociados y con un menor porcentaje de polisacáridos fermentados.

Sin embargo, no existe el mismo tipo de correlación cuando nos detenemos a observar los resultados obtenidos con los demás sustratos, e intentamos compararlos todos entre sí. La principal causa es la diferente composición de la fibra dietética de estos sustratos. Mientras que en el vino el polisacárido mayoritario parece ser arabinogalactano proteínas y manoproteínas, en el café son los galactomananos y arabinogalactanos, mientras que en el zumo de naranja son arabinogalactanos.

En la tabla 5, se muestran los monosacáridos de carácter neutro (“azúcares neutros”) que no fermentaron. Determinados por cromatografía de gases en el líquido resultante tras 24 horas de fermentación.

Tabla 5. Fermentación *in vitro* del complejo de fibra dietética del vino tinto, café soluble y zumo de naranja comercial. composición en azúcares neutros de los polisacáridos del complejo FDS^a que no fermentan.

	Bebida			
		Vino Tinto	Café	Z. Naranja comercial
Polisacáridos fermentados(g/L)	no	0.594±0.03	1.08±0.09	0.057±0.003
Az. Neutros no fermentados(g/L)				
Glucosa		0.029±0.001	0.019±0.001	0.0015±0.0001
Galactosa		0.052±0.003	0.081±0.007	0.0055±0.0005
Manosa		0.042±0.003	0.028±0.002	nd ^b
Xilosa		nd	nd	nd
Arabinosa		0.021±0.002	0.015±0.001	0.0011±0.0001
Fucosa		nd	0.0043±0.0002	nd
Ramnosa		0.0012±0.0001	0.00029±0.00002	71E-7±1E-8

^aFibra dietética soluble.

^b No detectado.

En el líquido resultante de la fermentación del complejo de FDS tanto del vino, como del café y del zumo aparecen mayoritariamente galactosa, manosa (aunque este último no en el zumo de naranja)(figura 4), sin embargo el porcentaje de fermentación de los polisacáridos de los que forman parte es diferente. Mientras que el vino tinto solo se determinaron en el líquido de fermentación el 35% de los monosacáridos de carácter neutro (“azúcares neutros”) constituyentes de los polisacáridos de la fibra dietética soluble, en el café y en el zumo de naranja la fermentación de estos polisacáridos fue mayoritaria, puesto que solo permanecieron en el líquido de fermentación el 2,7% en el caso del café y el 2,5 % en el caso del zumo de naranja.

En todos los sustratos la degradación de los residuos de xilosa es de 100%, lo que está relacionado con los elevados valores de butirato determinados. (Barry y Clifton, 1995).

En el caso del vino, los residuos de manosa, arabinosa y ramnosa son los más degradados (70, 71 y 65 %, respectivamente) además de xilosa (100%). Lo que parece indicar la fermentación mayoritaria de manoproteínas y sustancias pépticas.

En el caso del zumo de naranja, el AG es el polisacárido mayoritario, y sin embargo no fermenta tanto como cabría esperar; esto quizá se deba al tipo de AG que es. Se han descrito diversos tipos de AG, mas o menos ramificados, que fermentan a distintas velocidades. Por ejemplo el AG descrito en el alerce, tiene una fermentabilidad elevada pero lenta (Salyers y col.1981; Salyers y col. 1977).

En el caso del café el 97 % de los residuos de galactosa y el 98% de residuos de manosa son degradados durante las 24 horas de la fermentación, mientras que en el caso de los residuos de arabinosa la degradación es de solo un 94%. Esto indica que los galactomananos (GM) son degradados en mayor medida que los AG. Los AG estan fuertemente integrados en el complejo de la Fibra, e incluso pueden tener compuestos fenólicos asociados, ó proteína, provocando una mayor dificultad para la degradación bacteriana.

Figura 4 A. Cromatograma CGL de Az. Neutros presentes en liquido de fermentación del complejo de FDS del vino tinto

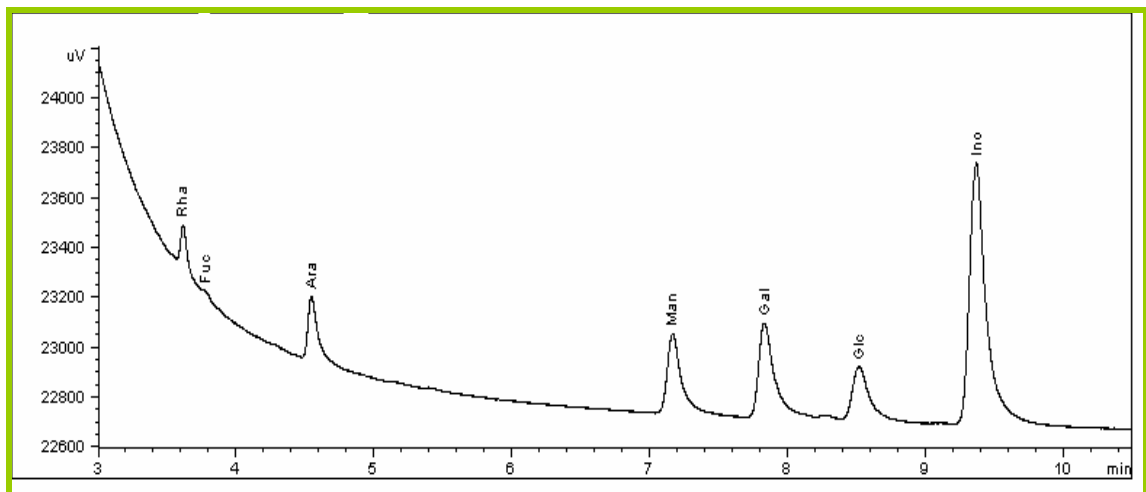


Figura 4 B. Cromatograma CGL de Az. Neutros presentes en liquido de fermentación del complejo de FDS de la infusión de café

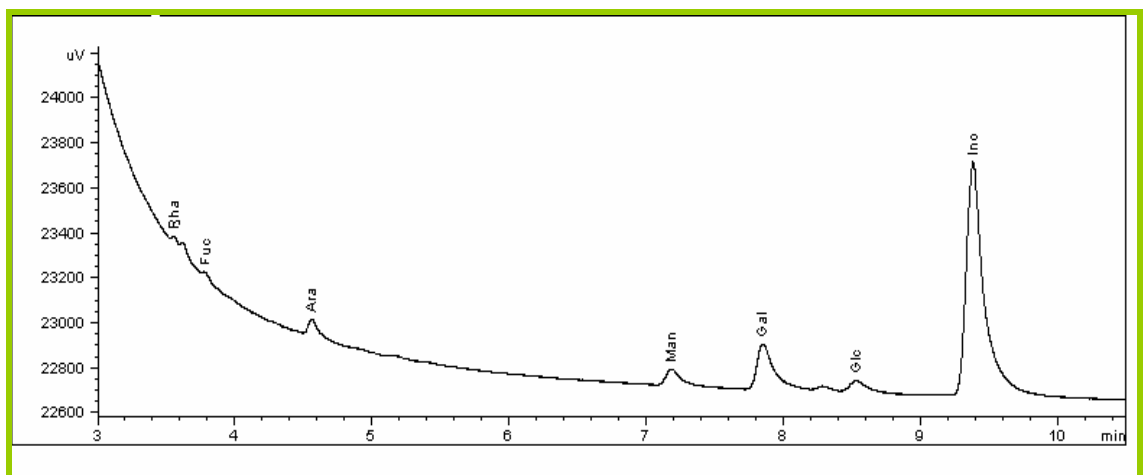
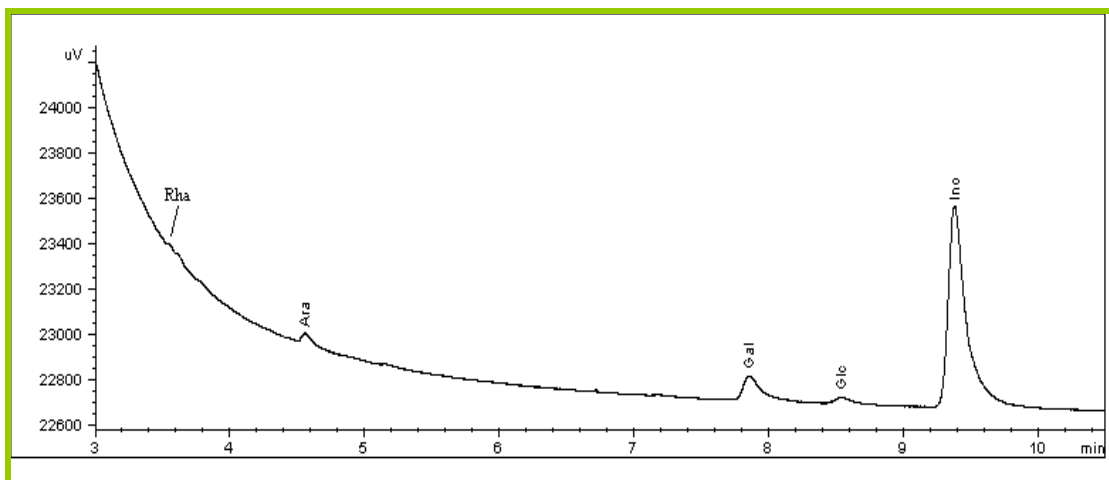


Figura 4 C. Cromatograma CGL de Az. Neutros presentes en liquido de fermentación del complejo de FDS del zumo de naranja



Teniendo en cuenta los resultados derivados de la degradación de los monosacáridos de carácter neutro ("azúcares neutros") constituyentes de los polisacáridos de la fibra dietética soluble, se ha concluido la existencia de diversas correlaciones entre el porcentaje de fermentabilidad de los complejos de FDS y ciertos polisacáridos (arabinogalactanos, arabinosilanos, galactomananos) que forman parte de estos complejos.

De esta manera podríamos decir que la producción de AAGCC del complejo, parece que deriva de los polisacáridos fermentados y no de otros compuestos (compuestos fenólicos, proteína) que también llegan al colon sin digerir.

3. FERMENTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS ASOCIADOS.

Como se ha demostrado en capítulos anteriores, la presencia de compuestos fenólicos asociados, formando parte del complejo de FDS, es un hecho. Por esta razón se intentó determinar hasta qué punto influye su presencia en la fermentación del complejo, así como su propia capacidad de fermentar.

En la tabla 6 se muestran los compuestos fenólicos presentes en la bebida, los que se encuentran asociados y lo que se determinaron en el líquido (sobrenadante) resultante de la fermentación, es decir los compuestos fenólicos liberados (del complejo) y/o transformados mediante diversas rutas metabólicas. Del mismo modo se cuantificó la actividad antioxidante de estos compuestos.

De esta tabla se deduce que el 68.5% de los compuestos fenólicos presentes en el complejo de FDS del vino, son liberados y/o transformados por la flora colónica, mientras que en el complejo del zumo de naranja solo se detectaron el 5.1%, de los que se encontraban asociados, es de suponer que el resto permanecieran como residuo no fermentado, puesto que otros estudios han demostrado que los compuestos fenólicos apenas generan AGCC, sin embargo los compuestos fenólicos determinados en el residuo no fermentado tras 24 horas de fermentación del complejo de FDS del z. de naranja, solo alcanzaba el 2% de los compuestos fenólicos asociados. Esto parece indicar que ciertamente el dióxido de carbono es uno de los metabolitos principales que se generan en la fermentación de quercetina y otros flavonoles como rutina, o flavanonas, como naringina (Rechner y col. 2004). Que por otra parte son compuestos fenólicos característicos de la naranja, y probablemente del complejo de FDS.

El porcentaje de compuestos fenólicos aparentemente liberados durante la fermentación, es muy diferente entre los 3 sustratos, esto está relacionado con el tipo de compuesto fenólico asociado en cada sustrato, y la manera en que este asociado, así como la molécula (tipo de polisacárido o incluso proteína resistente) a la que se encuentre unida.

También se determinó la capacidad antioxidante en todas las muestras, estableciéndose correlaciones entre los compuestos fenólicos liberados y/o transformados durante la fermentación. (determinación llevada a cabo en el sobrenadante de la fermentación, y por tanto donde se encontraran los compuestos fenólicos susceptibles de ser absorbidos)

Tabla 6. Fermentación *in vitro* del complejo de fibra dietética del vino tinto, café soluble y zumo de naranja comercial. Evolución de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, desde su ingesta (bebida) hasta su llegada al colon.

Bebida	BEBIDA		Asociados en el complejo ^a				Liberados en Fermentación		
	Compuestos Fenólicos ^b	Actividad Antioxidante ^c		Compuestos Fenólicos ^b	Actividad Antioxidante ^c		Compuestos Fenólicos ^b	Actividad Antioxidante ^c	
		FRAP	ABTS*		FRAP	ABTS		FRAP	ABTS
Vino Tinto	2.31±0.11	15649±370	14212±120	0.89±0.07	5038±121	2448±220	0.61±0.03	2327±152	6920±243
Café	3.61±0.04	25930±688	12953±165	1.05±0.02	6107±113	3869±22	0.58±0.04	3832±27	3979±31
Zumo Naranja	0.529±0.02	4036±105	2652±68	0.155±0.002	336±6	116±3	0.009±0.0004	31±2	169±5

^a Compuestos Fenólicos y actividad antioxidante asociados a la Fibra dietética soluble.

^b compuestos Fenólicos expresados como g. equivalentes de Ac. gálico/Litro de bebida

^cCapacidad antioxidante expresada en micromolesTrolox /Litro de bebida.

Existe correlación entre la capacidad antioxidante de los sobrenadantes de fermentación y sus respectivos compuestos fenólicos, cuando comparamos los diferentes sustratos entre sí, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.901, si comparamos con el método FRAP, y 0.92 si comparamos con método ABTS (tabla 6).

Del mismo modo se observó que existía correlación al comparar los compuestos fenólicos dentro del mismo sustrato, con sus respectivas capacidades antioxidantes, Así se puede hablar de buena correlación entre compuestos fenólicos del vino (en la “botella”, asociados, y en el sobrenadante de fermentación) y su actividad antioxidante determinada por el método FRAP (coeficiente de correlación de 0.999), pero no tan buena si empleamos la medida del ABTS (coeficiente de correlación de 0.86). En general las correlaciones realizadas teniendo en cuenta la actividad antioxidante por ABTS son peores, debido a que la concentración de compuestos fenólicos es demasiado pequeña para actividades antioxidantes tan elevadas. El método de determinación de actividad antioxidante por ABTS se basa en la capacidad del antioxidante de captar radicales libres (Re y col. 1999), luego puede ocurrir que durante la fermentación se generen otros compuestos no fenólicos pero que pueden actuar de la misma manera frente al radical ABTS*.

Por otra parte, no solo se cuantificaron los fenoles en el sobrenadante de fermentación, sino también se determinaron los compuestos fenólicos totales (espectrofotométricamente) en el residuo no fermentado (compuestos que se eliminarían con las heces) (Realizando el correspondiente ajuste con un blanco de fermentación sin muestra, sólo inóculo). De este modo se observó unas concentraciones de compuestos fenólicos en el residuo no fermentado inferior al que cabría esperar (tabla 7), con unos porcentajes de : 4.38% de compuestos fenólicos en el RNF (residuo no fermentado), del complejo FDS de vino tinto, 0.34 para su homólogo de café y 2% para el RNF resultante de la fermentación del complejo de FDS de zumo de naranja.

Teniendo en cuenta los valores presentados en la tabla, podemos deducir que el 27% de los compuestos fenólicos asociados en el complejo de FDS del vino no se detectaron, (no están ni en el sobrenadante de fermentación, ni en el RNF), probablemente por su transformación en metabolitos no identificables con las técnicas de las que se disponía en el laboratorio en su homólogo de café sucede con el 44%, mientras que en el caso del complejo de FDS de zumo de naranja este porcentaje alcanza el 97% ; diversos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos apenas generan AGCC durante la fermentación (Gonthier y col. 2003; Serrano, 2005) sin embargo sí generan otros compuestos como CO₂ y otros ácidos (fenilacético, fenilpropiónico), para cuya determinación no se disponían de los métodos necesarios en el laboratorio.

En la tabla 7 se observan los principales grupos de compuestos fenólicos (determinados por cromatografía líquida, CLAE) liberados durante la fermentación y por tanto susceptibles de ser absorbidos y llegar a otros órganos del cuerpo.

Tabla 7. Fermentación *in vitro* del complejo de fibra dietética del vino tinto, café soluble y zumo de naranja comercial. Evolución de los principales grupos de fenoles, desde su ingesta (bebida) hasta su llegada al colon. Comparación entre hidrólisis con celulasa (enzima no existente en organismo) y la hidrólisis producida de manera fisiológica en el colon

Grupos de compuestos Fenólicos^a	Vino tinto		
	En Bebida	Liberados por celulasa	Liberados en fermentación
Ac. Benzoicos^b	135.6±10.1	18.8±0.8	127.3±7.5
Ac. Hidroxicinámicos^c	162.8±9.3	8.8±0.3	4.1±0.3
Flavonoides^{d,e}	687.0±21.1	27.5±1.3	63.4±2.7
Antocianinas^f	58.3±3.2	4.2±0.3	8.8±0.5
Grupos de compuestos Fenólicos^a	Infusión de café		
	En Bebida	Liberados por celulasa	Liberados en fermentación
Ac. Benzoicos^b	141.6±5.2	11.2±0.7	312.5±9.4
Ac. Hidroxicinámicos^c	1422.0±40.2	4.6±0.3	nd ^g
Flavonoides^{d,e}	351.0±9.2	146.0±9.5	21.9±1.3
Antocianinas^f	nd	nd	13.1±1.1
Grupos de compuestos Fenólicos^a	Z. de naranja Comercial		
	En Bebida	Liberados por celulasa	Liberados en fermentación
Ac. Benzoicos^b	13.4±0.7	14.1±1.2	0.20±0.01
Ac. Hidroxicinámicos^c	75.4±2.3	70.7±4.1	nd
Flavonoides^{d,e}	131.3±8.3	39.9±3.1	5.2±0.3
Antocianinas^f	nd	nd	1.6±0.1

^a Compuestos fenólicos determinados por CLAE (HPLC) agrupados en los grupos más importantes expresados en mg/L.

^b Expresados como mg/L de ácido Gálico.

^c Expresados como mg/L de ácido cafeico.

^d Expresados como la suma de flavan-3-oles (expresados como mg/L de catequina), flavanonas (como mg/L de naringenina) y flavonoides (como mg/L de rutina).

^e Este grupo incluye: Flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas.

^f Expresados como mg/L de malvidina.

^g no detectado

En general, los compuestos fenólicos suelen degradarse a fenoles simples o compuestos no fenólicos. los productos derivados de la degradación fenólica pueden clasificarse como, no específicos (ácidos fenilpropiónicos hidroxilados) o específicos (ácido fenilactico hidroxilados) (Rechner y col. 2004).

El comportamiento de los compuestos fenólicos durante la fermentación es diferente en función de su estructura fenólica (Rechner, y col.2004), la flora colónica no se va a comportar de la misma

manera frente a un fenol ácido que frente a una antocianina, o flavonoide. En las figuras 5 A, 5 B, 5c, se observa claramente la variación porcentual de la composición fenólica (determinada por CLAE) al hacer un estudio comparativo del perfil fenólico en la bebida original. Comparándolo con el perfil que se obtiene en el sobrenadante de fermentación.

En todos los casos, excepto en zumo de naranja, los ácidos benzoicos son mayoritarios, mientras que los ácidos hidroxicinámicos son los que se encuentran en menor concentración.

Durante el proceso fermentativo, los ácidos hidroxicinámicos como el cafeico y sus ésteres son degradados a ácido hidroxifenilacético (HPA), ácido hidroxienilpranoico (HPP) y/o ácidos benzoicos (AB), e incluso los propios HPP pueden sufrir otra transformación a ácidos benzoicos (Gonthier y col. 2006), con lo que aumentaría sobremanera la concentración de ácidos benzoicos susceptibles de ser absorbidos (presentes en el sobrenadante de la fermentación).

En todos los sustratos analizados en este capítulo, los flavonoides y las antocianinas aparecen en cantidades importantes. Las proantocianinas, durante la fermentación son degradadas generando flavan-3-oles (normalmente epicatequina) y antocianinas, susceptibles ambas de ser absorbidas.

Figura 5 . Perfil fenólico de las diferentes muestras. Comparación entre hidrólisis con celulasa (enzima no existente en organismo) y la hidrólisis producida de manera fisiológica en el colon

Figura 5 a. Vino tinto

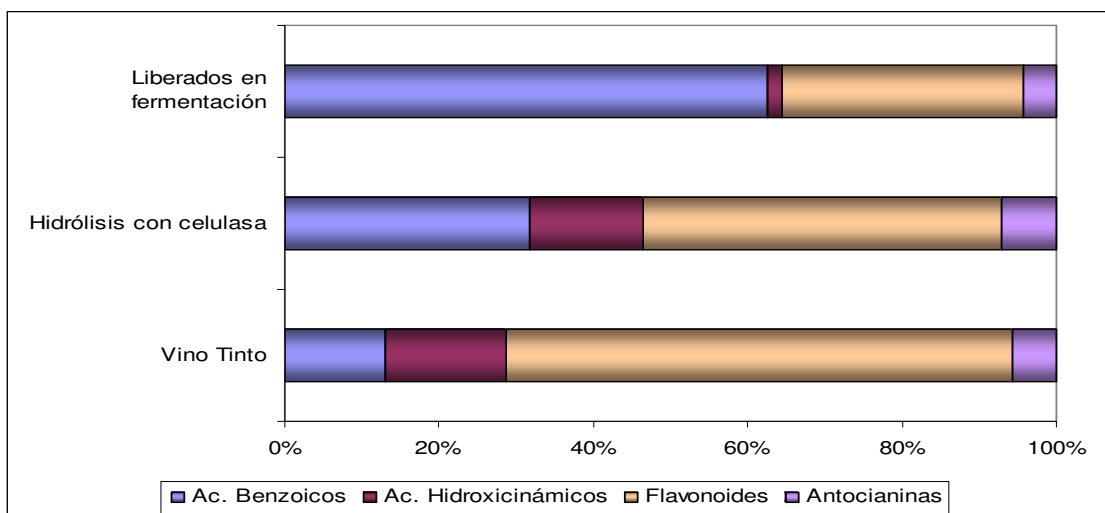


Figura 5 B. Infusión de cafe

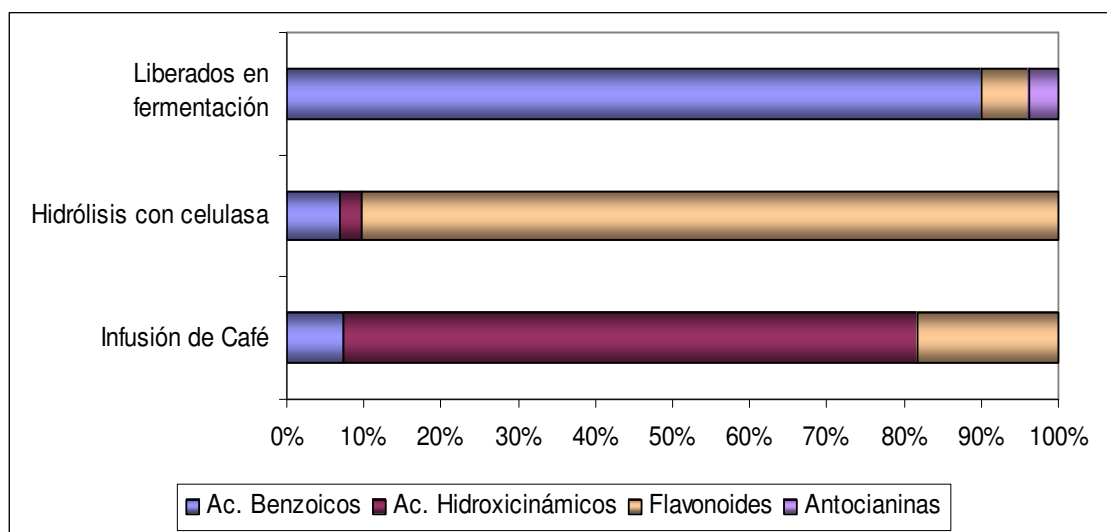
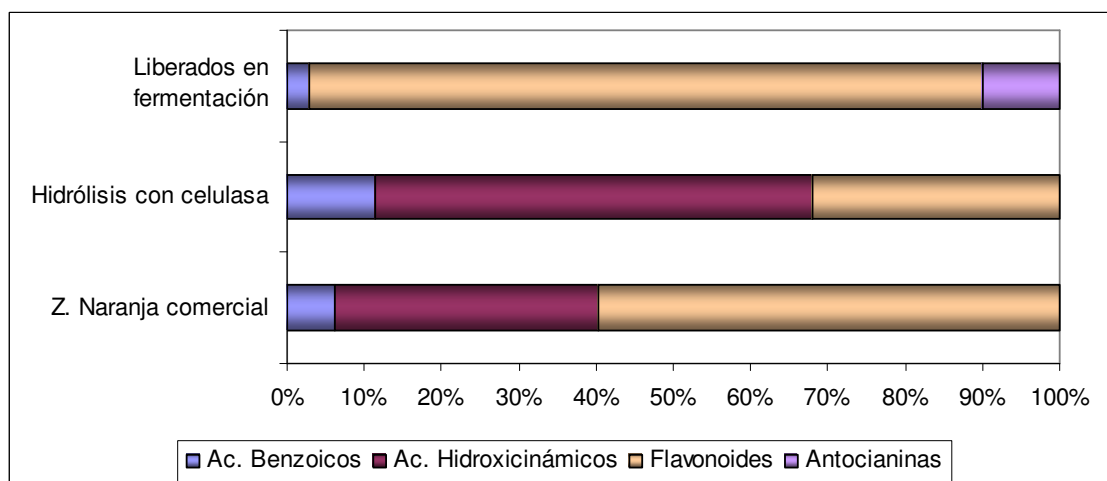


Figura 5 C. Zumo. Naranja



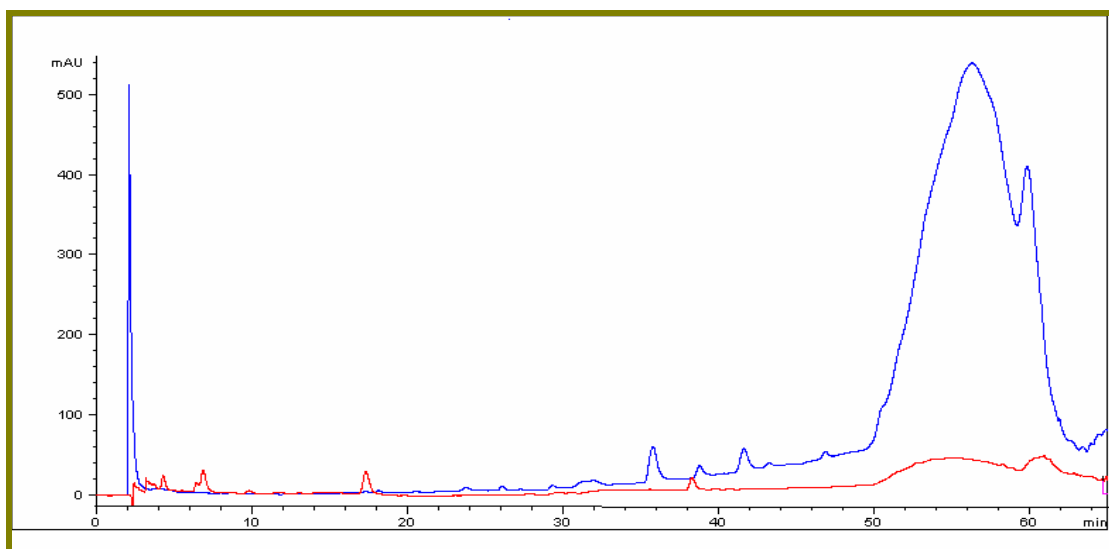
En todos los sustratos analizados en este capítulo, los flavonoides y las antocianinas aparecen en cantidades importantes. Las proantocianinas, durante la fermentación son degradadas generando flavan-3-oles (normalmente epicatequina) y antocianinas, susceptibles ambas de ser absorbidas.

Las proantocianinas no se detectan con el método de CLAE empleados en esta tesis, por eso, aunque tienen ciertas concentraciones (Prata y Oliveira, 2007; Felgines y col. 2006) no se detectaron en la infusión de café, ni el zumo de naranja (ciertas variedades de naranjas son ricas en antocianinas, además de que estamos tratando con un zumo comercial, que no sabemos con exactitud el tratamiento al que se ha visto sometido, ni los aditivos); y sin embargo si se detectaron antocianinas en los líquidos resultantes de la fermentación.

En el caso del zumo de naranja los flavonoides son los compuestos mayoritarios, que se han liberados y/o transformado durante la fermentación. Probablemente debido a la presencia de flavanonas, como la naringina, ya que la fermentación de este patrón puro proporcionaba una fermentabilidad muy elevada.

Por otra parte podemos establecer una comparación entre la hidrólisis enzimática con celulasa y los compuestos fenólicos determinados tras 24 horas de fermentación colónica *in vitro* (figura 6 a, B, C). La hidrólisis con celulasa se realizó con el objeto de conocer qué compuestos fenólicos estaban asociados en el complejo de FDS, es decir, aún siendo una hidrólisis enzimática (no química) su interés era puramente químico.

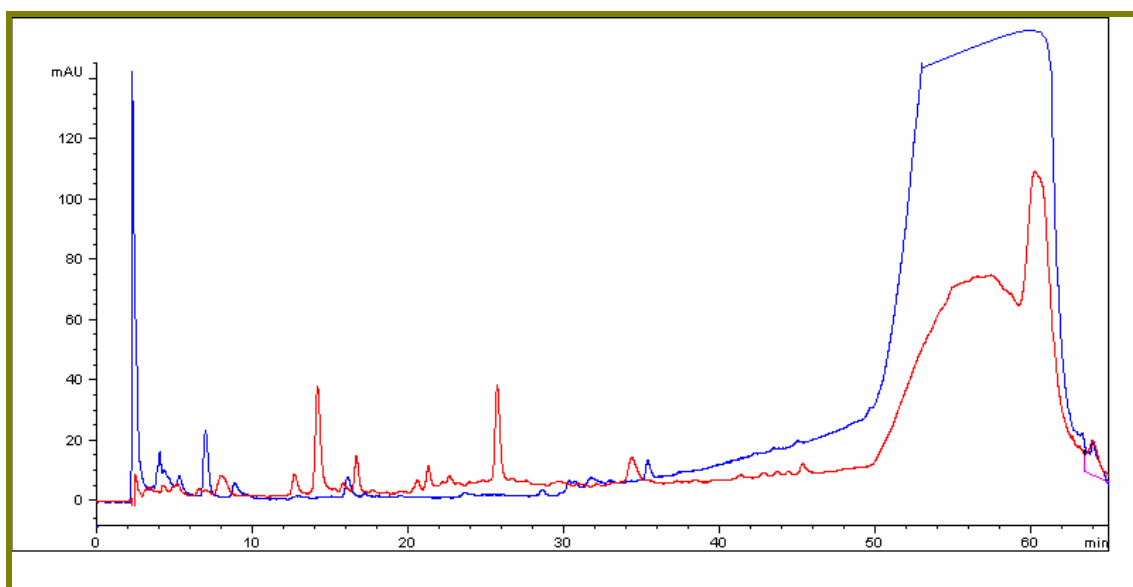
Figura 6 A. Cromatograma del sobrenadante del complejo FDS de vino fermentado frente al complejo de FDS hidrolizado con celulasa



En color azul se observa el cromatograma del sobrenadante de fermentación (compuestos fenólicos susceptibles de ser absorbidos) y en color rojo, el complejo hidrolizado con celulasa

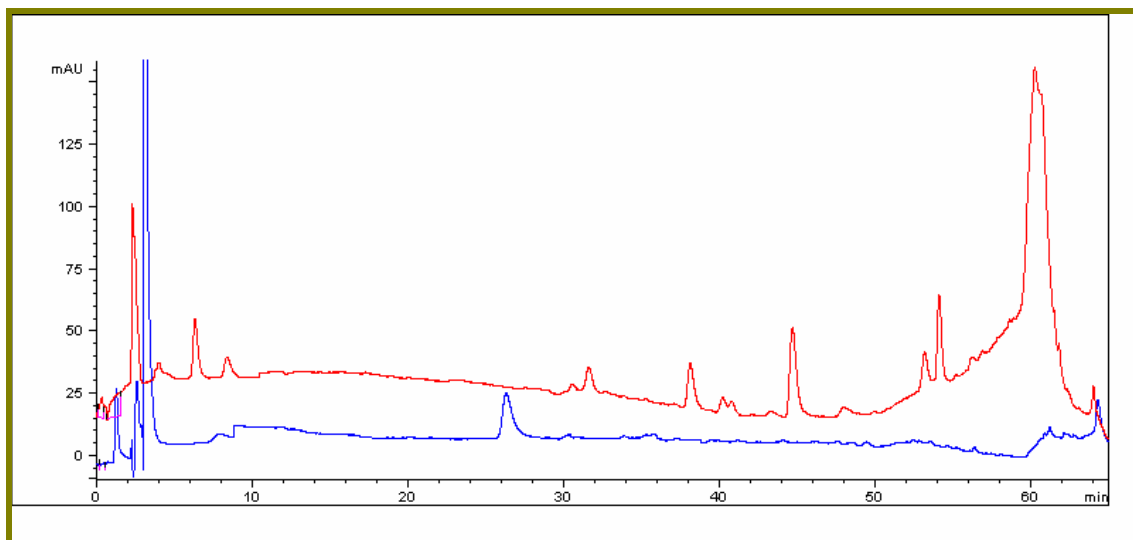
Al comparar ambos tipos de “hidrólisis”, observamos que son muy diferentes, liberándose distintos fenoles, obteniéndose un perfil fenólico distinto. Aunque se debe tener en consideración que la celulosa no es un enzima “fisiológica”

Figura 6 B. . Cromatograma del sobrenadante del complejo FDS de café frente al complejo de FDS de café hidrolizado con celulasa



En color azul se observa el cromatograma del sobrenadante de fermentación (compuestos fenólicos susceptibles de ser absorbidos) y en color rojo, el complejo hidrolizado con celulasa

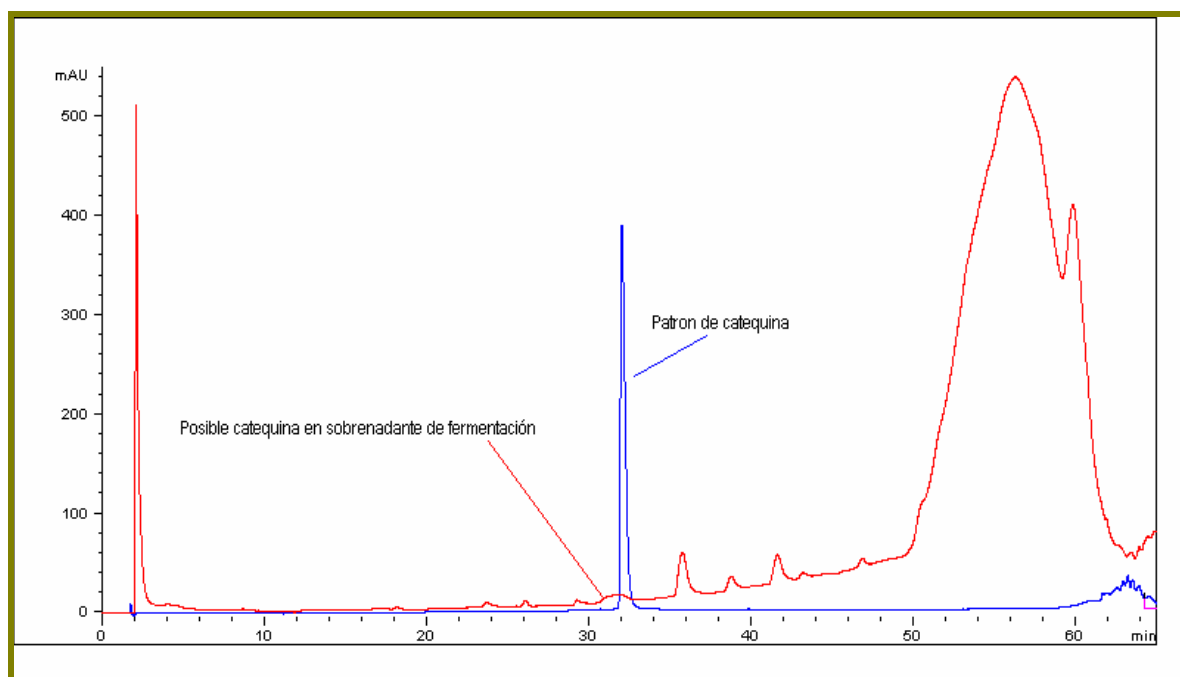
Figura 6 C. Cromatograma del sobrenadante de fermentación del complejo FDS de zumo de naranja frente al complejo de FDS hidrolizado con celulasa



En color rojo se observa el cromatograma del sobrenadante de fermentación (compuestos fenólicos susceptibles de ser absorbidos) y en color azul., el complejo hidrolizado con celulasa

Al hidrolizar con celulasa el complejo de FDs del vino tino, se liberaban mayoritariamente flavonoides, mientras que durante la fermentación son predominantes los ácidos benzoicos. Sin embargo cabe destacar la posible presencia de catequina en el sobrenadante de fermentación, y por tanto susceptible de ser absorbida (figura 7). Este dato concuerda con todos los estudios y erevisiones bibliograficas realizadas hasta la fecha (Rechner y col 2004), que explican el comportamiento de los flavan-3-oles durante el proceso de absorción

Figura 7. Cromatograma del sobrenadante de fermentación del complejo FDS de vino tinto frente al cromatograma de un patrón de catequina



En color rojo se observa el cromatograma del sobrenadante de fermentación del vino tinto (compuestos fenólicos susceptibles de ser absorbidos) y en color azul el patrón de catequina.

En el complejo de FDS de café la diferencia más grande se aprecia en el contenido en antocianinas, que solo aparecen tras la fermentación colónica..

En el zumo de naranja cabe destacar, al igual que en el café como al hacer hidrólisis con celulasa sí aparecen ácidos hidroxibenzoicos, mientras que al sufrir el proceso de fermentación probablemente son transformados en otros compuestos, como benzoicos.

En definitiva, este complejo de fibra dietética soluble (FDS) llegara intacto al colon, donde los polisacáridos sean fermentados por la microflora colónica, favoreciendo la liberación y posible fermentación de los polifenoles asociados (el grado de fermentabilidad dependera de la naturaleza del

polifenol). De este modo estos polifenoles y sus posibles productos de degradación pueden contribuir a crear un status antioxidante en el colon que contribuye a la prevención de diversas enfermedades, o ser susceptible de ser absorbidos y llegar a otros organos (higado).

En Resumen

Todos los complejos de FDS analizados han fermentado, aunque con diferentes grados de fermentabilidad (21.3%-55.1%), que se correlaciona con los polisacáridos principales determinados en el complejo, y su fermentabilidad (37.8-75%)

El perfil de AAGGCC de todos los sustratos denota que aun no teniendo gran fermentabilidad (21-55%), las proporciones molares de los AAGGCC obtenidos se encuentra muy cercano al ideal. Con importantes porcentajes de Acido propionico (relacionado con hipocolesterolemia).

Existe relación entre el porcentaje de polifenoles asociados en el complejo de FDS y la fermentabilidad de los sustratos. Al aumentar el porcentaje de compuestos fenólicos, disminuye la fermentabilidad del complejo.

El proceso de fermentación colónica *in vitro* parece implicar cierta liberación y en ocasiones transformación de los compuestos fenólicos asociados en el complejo de FDS. En el vino tinto un 68.5% de los compuestos fenólicos asociados al complejo, son susceptibles de ser absorbidos desde el colon. En el zumo de naranja solo el 5.85% de los compuestos fenólicos asociados al complejo, son susceptibles de ser absorbidos desde el colon, pero el resto no parecen en el residuo no fermentado lo que hace pensar en su transformación en CO₂, puesto que son mayoritariamente flavonoides.

En todos los caso analizados los principales grupos de compuestos fenólicos asociados al complejo , susceptibles de ser absorbidos desde el colon, (determinados en el sobrenadante de fermentación) fueron los ácidos benzoicos y los flavonoides, junto con desaparición o drástica disminución de acidos hidroxicinámicos.

El perfil fenólico del complejo de FDS, tras la hidrólisis con celulasa es diferente al obtenido tras la acción de las bacterias intestinales de la fermentación.

CONTRIBUCIÓN DE LAS BEBIDAS A LA INGESTA DE FIBRA DIETÉTICA
SOLUBLE

I ANTECEDENTES

Con algunas excepciones los patrones dietéticos tradicionales se basaron hasta el siglo pasado, en alimentos de naturaleza vegetal, sin procesar (crudos) ó minimamente procesados; de este modo, basándose en el consumo de cereales, legumbres, frutas y vegetales, estas dietas proporcionaban un importante aporte de fibra dietética. Este modelo dietético continuó manteniéndose en la mayoría de poblaciones que vivían en países en vías de desarrollo y aquellos vegetarianos de países desarrollados (Lairon y col. 2003); sin embargo los recientes y drásticos cambios que se han producido en los países industrializados han permitido la aparición de modelos dietéticos basados principalmente en alimentos de origen animal y cereales refinados, reduciéndose el aporte de fibra dietética a la dieta. De hecho, la fibra dietética llegó a considerarse como un constituyente más de los alimentos, no necesario en la alimentación, considerada como un residuo desechable solo apto para alimentación animal (salvado, germen de trigo).

Esta actitud comenzó a cambiar a partir de los años 70, siendo el desencadenante el pionero estudio llevado a cabo por Burkitt y Trowell (1975), que mostraba la diferente incidencia de diversas enfermedades y patologías en poblaciones blancas y nativas africanas; estos investigadores sugirieron que una deficiencia en el consumo de fibra dietética, podría estar involucrada en la etiología de diversas enfermedades de países desarrollados, como diverticulosis, problemas cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer.

A raíz del estudio de Burkitt y Trowell comenzaron a surgir otros muchos, que trataban de afianzar su hipótesis, así como elucidar los posibles mecanismos involucrados.

En las últimas décadas se han publicado diversos estudios que relacionan la ingesta de fibra dietética con riesgo cardiovascular; Kromhout y sus colaboradores (1982) observaron cómo aquellos voluntarios que consumían mayores cantidades de fibra, tenían un riesgo 4 veces menor de muerte por problemas cardiovasculares, que aquellos voluntarios que consumieron la menor cantidad. Más recientemente un estudio publicado por Rimm y col en 1996, mostró una relación inversa entre ingesta de fibra dietética y muerte provocada por enfermedad cardiovascular.

Otros estudios (Burkitt, 1981; El-Serag, Saia, Rabeneck, 2005; Wu y col. 2007), han mostrado como la ingesta de fibra dietética está asociada con prevención de hernia de hiato, o en la reducción de adenocarcinomas de estómago y esófago.

Existen numerosos estudios clínicos y epidemiológicos que soportan la afirmación de la contribución de los alimentos vegetales al mantenimiento de la salud gastrointestinal y de la disminución

en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Los efectos beneficiosos en la salud gastrointestinal se atribuyen fundamentalmente a la fibra dietética, mientras que la fibra dietética junto con otros constituyentes como diversos antioxidantes, folatos.. contribuyen a la prevención de problemas de origen cardiovascular y prevención de cáncer (Flood y col. 2002).

Martínez-González y col. 2002; Mennen y col 2002; Saura-Calixto y Goñi, 2004 han descrito cómo los efectos beneficiosos de la dieta Mediterránea sobre la disminución de riesgo cardiovascular están relacionados con el elevado consumo de fibra derivada del consumo de frutas y verduras.

La ingesta de fibra dietética debería situarse entre 30-35 g/día ó 10-13 g/1000kcal, de acuerdo con guías dietéticas publicadas por diversas organizaciones internacionales (FAO/OMS); del mismo modo se recomienda que al menos un 30% de la fibra total sea fibra dietética soluble. Tener en cuenta las proporciones de fibra soluble e insoluble recomendadas es importante, puesto que cada tipo de fibra tiene un efecto diferente. Pietinen y colaboradores en 1996; Bazzano y colaboradores (2003) observaron que el principal efecto de la fibra dietética soluble se concentraba en la disminución de la incidencia de problemas cardiovasculares y coronarios. Del mismo modo Fernández y colaboradores en 2001, mostraron evidencias del efecto hipocolesterolemiante de esta fibra.

El informe Europeo de nutrición y salud (Elmadfa y Weichselbaum, 2005), indicaba sin embargo, un consumo actual de fibra dietética de 16-21 g/p/día en la Unión Europea.

Existen diferencias significativas en la “calidad” de la fibra dietética debido a las diferentes dietas consideradas en las diferentes regiones europeas; en los países del norte de Europa la principal fuente de fibra son los cereales (54-64%) mientras que en países mediterráneos, como Francia o Italia los cereales solo suponen un 34-49% del aporte de fibra dietética. La ingesta de frutas y vegetales es mayor en países Mediterráneos, que por otra parte poseen un mayor porcentaje de FDS que los cereales (Luna y Buttriss. 2007). Por ello la “calidad” de la fibra dietética difiere.

Los datos referidos por Saura-Calixto y Goñi (2004) sitúan la ingesta de fibra dietética en la población española en 18.3 g/p/día, de la que aproximadamente el 30 % es fibra soluble. (tabla 1). Estos datos de consumo solo se encuentran referidos a alimentos sólidos vegetales, sin embargo como se ha demostrado a lo largo de esta tesis las bebidas de la dieta española contienen FDS.

Tabla 1. Ingesta de fibra dietética en la población Española^a

Grupo de Alimentos	Consumo diario (g/p/d) ^b	Ingesta de Fibra Dietética ^a (g/p/d)	
		Soluble	Insoluble
Cereales	231.2	1.95	5.33
Vegetales	311.2	1.90	2.79
Legumbre	12.9	0.23	0.52
Frutas	264.4	2.09	2.96
Frutos secos	7.9	0.13	0.45
Total	827	6.30	12.05
Fibra Dietética Total (FDS+FDI)= 18.35			

^a Fuente de los datos: Saura-Calixto y Goñi (2004).^b gramos/persona/día

Como se ha descrito en capítulos anteriores el contenido en FDS varía mucho de una bebida a otras, siendo realmente elevado en el café y zumo de tomate y muy inferior en el mosto o manzanilla y refrescos. Sin embargo, se debe tener en cuenta su contribución a la ingesta total de FDS, fundamentalmente en aquellas bebidas que como el café son de elevado consumo en la población española.

Por ello el objetivo principal de este capítulo será demostrar la contribución a la ingesta de la FDS en la población española.

II RESULTADOS y DISCUSIÓN.

1. MUESTRAS.

Para realizar este estudio se han seleccionado las bebidas de consumo mayoritario entre la población española, según los datos publicados por el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA, 2005). Para la obtención de estos datos de consumo, el ministerio ha empleado una metodología basada en 3 tipos de Investigaciones: investigación en Hogares (Universo: 15 460 000 hogares), investigación en Hostelería/Restauración (Universo: 241 490 establecimientos (número medio, pues varía según la temporada)), investigación en Instituciones (Universo: 25 179 establecimientos con 681 millones de servicios).

Las bebidas más consumidas en España durante el año 2005, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Bebidas de mayor consumo entre la población española

Tipo de bebida	Consumo (l/p/año)			Total
	Hostelería	Instituciones	Hogares	
Vino de Mesa	9.22	0.18	7.7	17.1
Vino D.O. ^a	6.55	0.042	2.78	9.37
Sidra	1.36	0.006	0.305	1.67
Cerveza	46.12	0.21	16.22	62.55
Mosto	0.99	0.043	0.322	1.35
Zumos y Nectares	5.48	0.46	11.728	17.66
Refrescos	22.55	0.45	37.987	60.98
Café e infusiones ^b	2.42	0.066	1.79	4.27

^a Denominación de Origen.

^b Café e infusiones se expresan: kg/p/año

Las muestras seleccionadas para el estudio se agruparon de la siguiente manera:

Grupo 1. Zumos y nectares de frutas y vegetales.

Grupo 2. Bebidas alcohólicas.

Grupo 3. Café e infusiones.

Grupo 4. Refrescos y otras bebidas.

2. MÉTODOS.

Se determinó la FDS (polisacáridos) siguiendo el método descrito ampliamente en el capítulo Metodología, consistente en 4 etapas fundamentales: preparación de muestra, tratamientos enzimáticos, diálisis y finalmente la determinación de la fibra dietética soluble (Saura-Calixto y col. 2002; Díaz-Rubio y Saura-Calixto 2006).

A la hora de establecer la contribución de la FDS de las bebidas a la ingesta de FDS y FDT de la población española, se ha considerado una cifra de población española de 40 millones:

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los últimos datos referidos por Saura-Calixto y Goñi (2004) muestran cómo la ingesta de fibra dietética en la población española es deficitaria (18.35g/p/día), aunque esta ingesta al menos es de buena "calidad", puesto que el 6.3 de esta FDT corresponde a FDS, aproximadamente el 30% recomendado.

Sin embargo, estos datos no contemplan la posible contribución de las bebidas, que como se ha demostrado en capítulos anteriores poseen cantidades nada despreciables de fibra dietética soluble (tabla 3).

En la tabla siguiente (tabla 3) se incluyen datos de consumo de bebidas e ingesta de fibra dietética en relación con ese consumo. De dicha tabla se deduce que si se tiene en cuenta el consumo de bebidas, la ingesta diaria actual de fibra dietética soluble aumenta hasta un 7.3% y la fibra dietética total sobrepasaría el 19%.

Las bebidas naturales (zumos de frutas, café, cerveza, vino o bebida de cacao) tienen un contenido significativo de fibra dietética (2.37 g/L en el zumo de melocotón, 2.08 en la cerveza rubia, 1.4 en vino tinto ó 7.53 en el café). Al proceder del prensado y/o fermentación de frutas y cereales, una parte de la fibra soluble de estos productos vegetales se solubiliza en la bebida correspondiente. Por el contrario las bebidas refrescantes (refresco de cola, tónica, bebida isotónica), son las que menor concentración de fibra tienen.

De todas las bebidas analizadas para esta memoria, son las bebidas de cacao y el café las que presentan una mayor concentración de fibra dietética soluble (7.53-7.17g/L). El café y el cacao soluble proceden del mismo tipo de materia prima: una semilla de la que mediante un procedimiento industrial se ha obtenido un extracto liofilizado soluble a partir del cual se prepara la bebida. Por esta razón la concentración determinada en ambas bebidas es similar.

Si se considera la concentración de fibra dietética soluble por grupos, se observa cómo, aunque individualmente los zumos no destaquen por su concentración de fibra, al tener en cuenta la totalidad de los zumos estudiados, este grupo es el que presenta una mayor concentración de fibra.

De todas las bebidas analizadas, es la bebida de cacao la que contribuye en mayor medida a la ingesta actual de fibra dietética soluble (8.4%), seguida por cerveza con alcohol (3.77) > Cerveza sin alcohol (0.49) > zumo de melocotón (0.37%) > vino tinto (0.29%) (tabla 3).

La bebida de cacao es la bebida que más contribuye, por dos razones, es una bebida muy consumida (82ml/p/d, solo superada por cerveza) y es la bebida con un mayor porcentaje de fibra dietética soluble. La cerveza es la segunda en el "ranking", ya que aún teniendo un porcentaje de FDS bastante inferior sin embargo es la bebida mas consumida (127ml/p/dia) (MAPA, 2005).

Sin embargo entre los menores de 18 años que no deben beber alcohol la contribución a su ingesta de FDS se debería en primer lugar a bebida de cacao, y después al zumo de melocotón.

Tabla 3. Contribución de las bebidas a Ingesta de fibra dietética.

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Ingesta ^b (ml/p/d)	FDS(g/ingesta) ^c	Contribución(%)a la Ingesta Actual de	
					FDS ^d	FDT ^e
Zumos y Nectares Frutas/verduras	Manzana	1.67±0.01	0.54	0.0009	0.01	0.004
	Naranja comercial	0.79±0.01	10.01	0.0079	0.11	0.041
	Naranja natural	1.41±0.02	1.51	0.0021	0.03	0.011
	Naranja y soja	1.72±0.08	2.19	0.0038	0.05	0.019
	Piña	0.901±0.07	11.42	0.0103	0.15	0.054
	Melocoton	2.37±0.06	10.85	0.0257	0.37	0.135
	Piña y uva	0.307±0.005	3.07	0.0009	0.01	0.005
	Melocoton y Uva	2.33±0.02	3.08	0.0072	0.11	0.037
	Mosto	0.356±0.006	3.09	0.0011	0.02	0.006
	Z.Tomate	4.126 ±0.1	2.20	0.0091	0.13	0.047
Total zumos y nectar		15.98±0.02	47.94	0.0689	0.98	0.363
Bebidas Alcohólicas	Cerveza sin alcohol	1.09±0.06	32.01	0.0349	0.490	0.183
	Cerveza rubia con alcohol	2.08±0.04	127.00	0.2642	3.770	1.390
	Cerveza negra	3.5±0.02	1.64	0.0057	0.082	0.030
	Vino Blanco	0.12±0.02	5.61	0.0007	0.009	0.003
	Vino Tinto	1.4±0.002	14.81	0.0207	0.296	0.109
	Sidra	0.17±0.01	4.30	0.0007	0.010	0.003
Total bebidas alcohólicas		8.36±0.01	185.34	0.3269	4.670	1.721

Tabla 3 (continuación)

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Ingesta ^b (ml/p/d)	FDS(g/ingesta) ^c	Contribución(%)a la Ingesta Actual de	
					FDS ^d	FDT ^e
Café e Infusiones	Te Rojo	0.131±0.05 ₁	0.11	0.00001	0.0002	0.00007
	Café soluble	7.530±0.04 ₁	1.37	0.01028	0.1460	0.05407
	Poleo	0.156±0.002	0.11	0.00002	0.0002	0.00009
	Manzanilla	0.078± 0.002	0.15	0.00001	0.0002	0.00006
Total café e infusiones		7.86±0.09 ₉	1.74	0.01031	0.1474	0.05430
Refrescos y otros	Bebida de cacao	7.17±0.1000	82.10	0.5879	8.399	3.0944
	Bebida de cola	0.0840±0.0009	77.81	0.0065	0.093	0.0343
	Bebida Isotonica	0.0200± 0.0001	10.12	0.0002	0.003	0.0010
	Refresco de naranja	0.2400±0.005 ₁	31.80	0.0076	0.109	0.0401
	Agua Tonica	0.0200±0.0001	6.22	0.0001	0.002	0.0006
	Horchata	1.0040±0.009 ₁	1.12	0.0011	0.016	0.0059
Total refrescos y otros		8.5380±0.09 ₉₉	209.06	0.6035	8.622	3.1766
TOTAL		40.74±0.03	444.08	1.0097	14.425	5.31457

^aFibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles).^b ml/persona/día (MAPA, 2005).^c gramos de FDS que contiene la cantidad diaria ingerida de cada bebida.^dIngesta actual de FDS teniendo en cuenta aporte de bebidas =7.3g/p/día.^e Ingesta actual de FDT teniendo en cuenta aporte de bebidas= 19.65g/P/día

Por grupos de bebidas, el grupo que más contribuye a la ingesta actual de Fibra dietética total y soluble es el grupo de refresco y otras bebidas. El orden sería el siguiente:

Refrescos y otras bebidas (8.6% FDS y 3.17% FDT) > bebidas alcohólicas (4.67% FDS y 1.72% FDT) > Zumos y néctares (0.98% FDS y 0.36 % FDT) > Café e infusiones (contribuye con 0.14 % a la FDS y 0.054 % a la FDT) .

El total de estas bebidas aporta el 5.3 % de la ingesta actual de fibra dietética total (FDT) contribuyendo en mayor medida que los frutos secos; por otra parte el 3.36% de la ingesta recomendada de FDT es fibra dietética soluble proveniente de las bebidas. De esta manera se cubriría el 33.6% de la ingesta recomendada de FDS solo mediante la ingesta de actual diaria de todas las bebidas descritas en esta tesis. Aunque este dato puede ser revelador, ciertamente es relativo, puesto que nadie consume exactamente esas cantidades de cada una de esas bebidas todos los días.

En la tabla 4 se muestran datos que podrían acercarse mas a la realidad, puesto que se muestra la contribución teniendo en cuenta las raciones de cada bebida. Excepto en el caso de las infusiones, que una ración puede considerarse más subjetivamente (no todo el mundo bebe el café igual de fuerte), el resto de raciones se han establecido de acuerdo a las monodosis (zumos) o latas (refrescos, cervezas), que se venden comercialmente.

Según los datos presentados en dicha tabla (tabla 4), si se consumiera una ración de cada una de estas bebidas en un día, se sobrepasaría la ingesta actual de fibra dietética soluble actual en un 22% , pero supondría un 85% de la fibra dietética soluble recomendada.

De nuevo la bebida de cacao vuelve a ser la bebida que contribuye en mayor medida a la ingesta (una ración supone el 7.55% de la fibra dietética total actual y 4.78% de la fibra dietética recomendada), seguida por la cerveza rubia con alcohol (una lata supone el 3.6% de la ingesta de fibra dietética total actual) y cerveza negra(una lata supone el 6.08% de la ingesta de fibra dietética total actual).

Estos datos quizá sean más fiables que los obtenidos a partir de los datos de ingesta proporcionados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), puesto que parece se acercan más a la realidad de ingesta. Con estos valores observa como una lata de cerveza aporta el 3.61% de la fibra dietética total recomendada al día, y un adulto bien puede ingerir no una sino hasta dos latas diarias de cerveza sin perjuicio para la salud. Mientras que un niño o adolescente se podría tomar diariamente una bebida de cacao para desayunar, lo que aportaría un 4.78% de la ingesta recomendada de fibra dietética total

Tabla 4. Contribución de las bebidas a Ingesta de fibra dietética(por ración)

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Racion ^b (ml)	FDS ^c (g) /racion	Contribución(%)a la Ingesta Actual de	
					FDS ^d	FDT ^e
Zumos y Nectares Frutas/verduras	Manzana	1.67±0.01	200	0.33	4.7	1.7
	Naranja comercial	0.79±0.01	200	0.15	2.2	0.8
	Naranja natural	1.41±0.02	200	0.28	4.0	1.5
	Naranja y soja	1.72±0.08	200	0.34	4.9	1.8
	Piña	0.901±0.07	200	0.18	2.5	0.9
	Melocoton	2.37±0.06	200	0.47	6.8	2.5
	Piña y uva	0.307±0.005	200	0.06	0.8	0.3
	Melocoton y Uva	2.33±0.02	200	0.46	6.6	2.4
	Mosto	0.356±0.006	200	0.07	1.1	0.4
	Z.Tomate	4.126 ±0.1	200	0.82	11.8	4.3
Total zumosy nectar		15.98±0.02	2000	3.19	45.6	16.8
Bebidas Alcoholicas	Cerveza sin alcohol	1.09±0.06	330	0.36	5.1	1.89
	Cerveza rubia con alcohol	2.08±0.04	330	0.68	9.8	3.61
	Cerveza negra	3.5±0.02	330	1.15	16.5	6.07
	Vino Blanco	0.12±0.02	150	0.02	0.3	0.09
	Vino Tinto	1.4±0.002	150	0.21	3.0	1.10
	Sidra	0.17±0.01	150	0.02	0.4	0.13
Total bebidas alcoholicas		8.36±0.01	1440	2.45	35.1	12.91

Tabla 4. (Continuación)

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Racion ^b (ml)	FDS ^c (g) /racion	Contribución(%)a la Ingesta Actual de	
					FDS ^d	FDT ^e
Café e Infusiones	Te Rojo	0.131±0.05	150	0.02	0.28	0.10
	Café soluble	7.5±0.04	150	1.12	16.07	5.92
	Poleo	0.156±0.002	150	0.02	0.33	0.12
	Manzanilla	0.078± 0.002	150	0.01	0.17	0.06
Total café e infusiones		7.86±0.09 _g	600	1.18	16.85	6.21
Refrescos y otros	Bebida de cacao	7.17±0.1	200	1.434	20.49	7.55
	Bebida de cola	0.084±0.0009	330	0.028	0.39	0.15
	Bebida Isotonica	0.02± 0.0001	330	0.007	0.09	0.03
	Refresco de naranja	0.24±0.005	330	0.079	1.13	0.42
	Agua Tonica	0.02±0.0001	330	0.007	0.09	0.03
	Horchata	1.004±0.009	200	0.201	2.87	1.06
Total refrescos y otros		8.5380±0.09 _{gg}	1720	1.755	25.07	9.24
TOTAL		40.74±0.03	5760	8.586	122.65	45.19

^aFibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles).^b Consumo usual/persona/día (monodosis).^c Gramos de FDS que contiene una ración diaria ingerida de cada bebida.^dIngesta actual de FDS teniendo en cuenta aporte de bebidas =7g/p/día.^e Ingesta actual de FDT teniendo en cuenta aporte de bebidas= 19.65g/P/día

Diariamente se consumen en España por término medio 1.1 Kg de alimentos sólidos (vegetales, carnes, pescados, huevos) y 0.95 L de líquidos (Leche, aceite, cerveza, vino, zumos, refrescos) (MAPA, 2005). La ingesta de fibra de fibra procede procede casi en su totalidad de alimentos sólidos de origen vegetal. Sin embargo teniendo en cuenta los datos de consumo, es lógico pensar en que las bebidas puedan aumentar el consumo de fibra, especialmente de fibra dietética soluble. Si incluimos la fibra dietética que aportan las bebidas a los datos de consumo, observaríamos como el total de estas bebidas contribuye en un 13.08% a la ingesta de fibra dietética soluble (tabla 5) y aporta el 5.3 % de la ingesta actual de fibra dietética total (FDT) (figura1) contribuyendo en mayor medida que los frutos secos.

Tabla 5. Ingesta y contribución a la fibra dietética soluble en España. Incluyendo bebidas.

Grupo de Alimentos	Consumo diario (g/p/d)	Fibra Dietética ^a (g/p/d)		Contribución de alimentos a la FDS (%)
		Soluble	Insoluble	
Cereales	231.2	1.95	5.33	26.67
Vegetales	311.2	1.90	2.79	25.99
Legumbres	12.9	0.23	0.52	3.14
Frutas	264.4	2.09	2.96	28.59
Frutos secos	7.9	0.13	0.45	1.78
Bebidas^{a,b}	448.08	1.01	ND ^c	13.08
Total	827	7.31	12.05	100
Fibra Dietética Total (FDS+FDI)= 19.36				

^a solo se han tenido en cuenta las bebidas analizadas en el estudio.

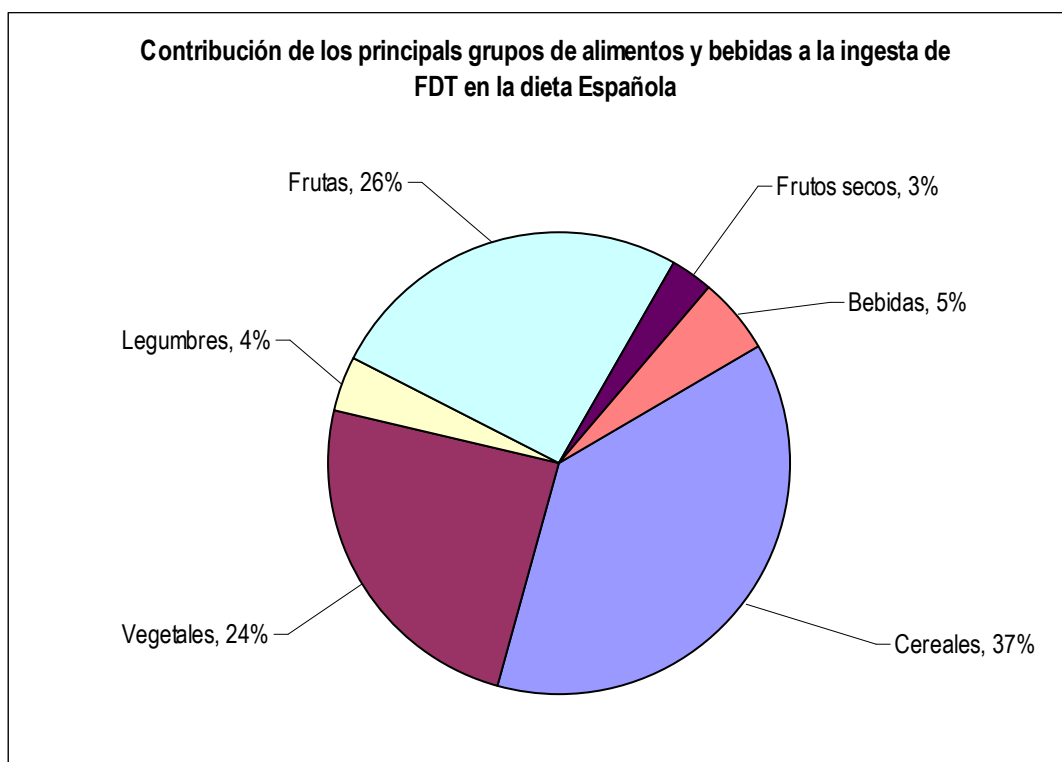
^b ml/persona/día

^c no detectado

Según estos datos el aporte del total de las bebidas a la ingesta de fibra dietética soluble es superior a de frutos secos (1.78%) y legumbres (3.14%). Sin embargo estos datos pueden resultar engañosos, ya que se han empleado todas las bebidas analizadas para elaborar los datos; y ciertamente es casi imposible que una misma persona consuma todas esas bebidas en las cantidades indicadas por el Ministerio , en el mismo día.

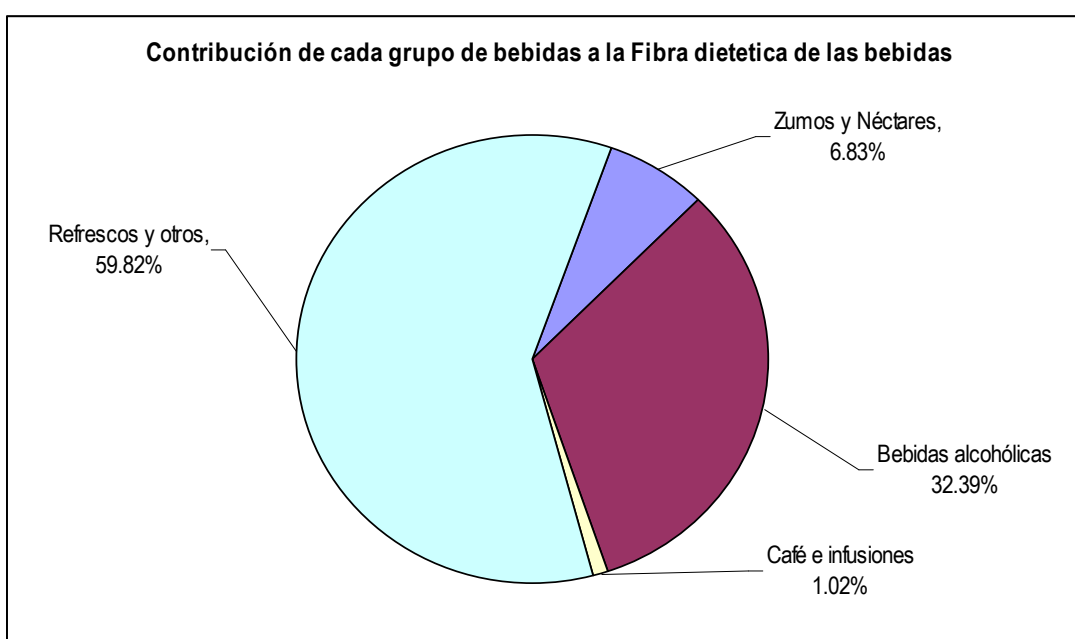
También se debe tener en cuenta que para elaborar los datos se ha incluido toda la población 40 millones de personas (MAPA 2005) y todas las bebidas; y sin embargo los menores de 18 años no deberían tomar bebidas alcohólicas, así como es de esperar que los adultos tomen mayoritariamente café antes que bebida de cacao.

Figura 1. Contribución a la ingesta de fibra dietética total de los principales grupos de alimentos



En consecuencia se han elaborado datos teniendo en cuenta los diferentes grupos de bebidas (figura 2), siendo el grupo formado por refrescos y otros (59%) los que contribuyen en mayor medida a la fibra proveniente de las bebidas, seguido por las bebidas alcohólicas (32%) y los zumos (6.32%)

Figura 2. Contribución de cada grupo de bebidas a la Fibra dietética soluble que aportan las bebidas a la dieta



También podemos saber qué zumo o bebida alcohólica sería más recomendable desde el punto de vista de aporte de fibra (figuras 3, 4). Según esta figura (figura 3) el zumo que más fibra dietética soluble aporta dentro del grupo de los zumos es el zumo de melocotón (38%), seguido por el mosto (15%).

Figura 3. Aporte de cada zumo a la FDS proveniente del grupo de los zumos.

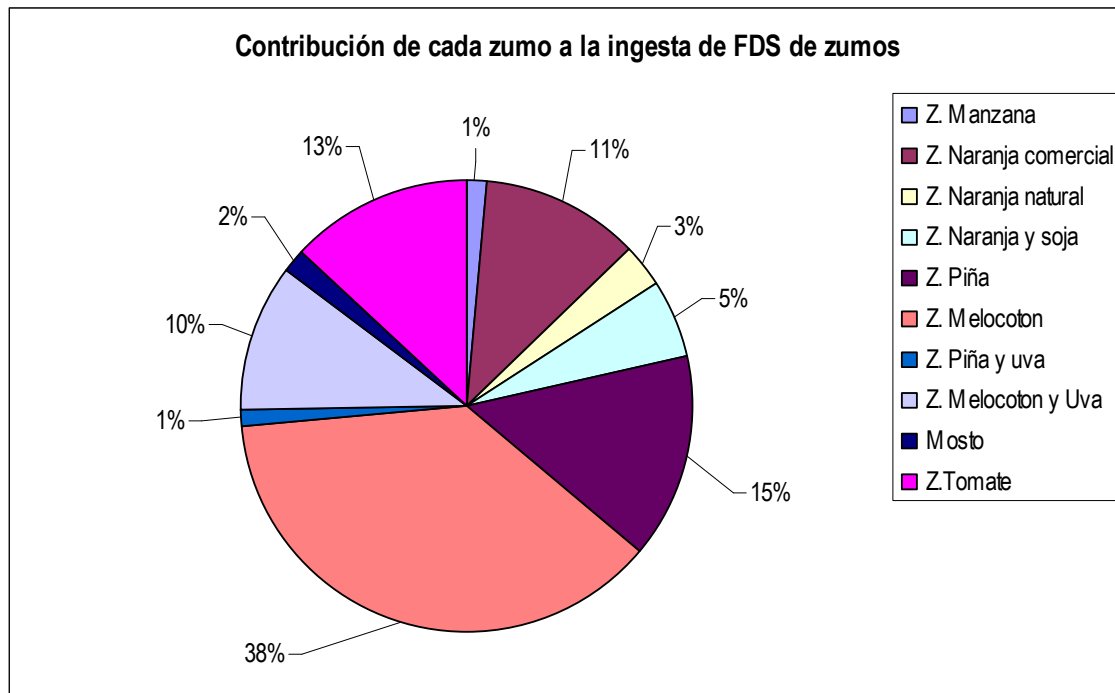
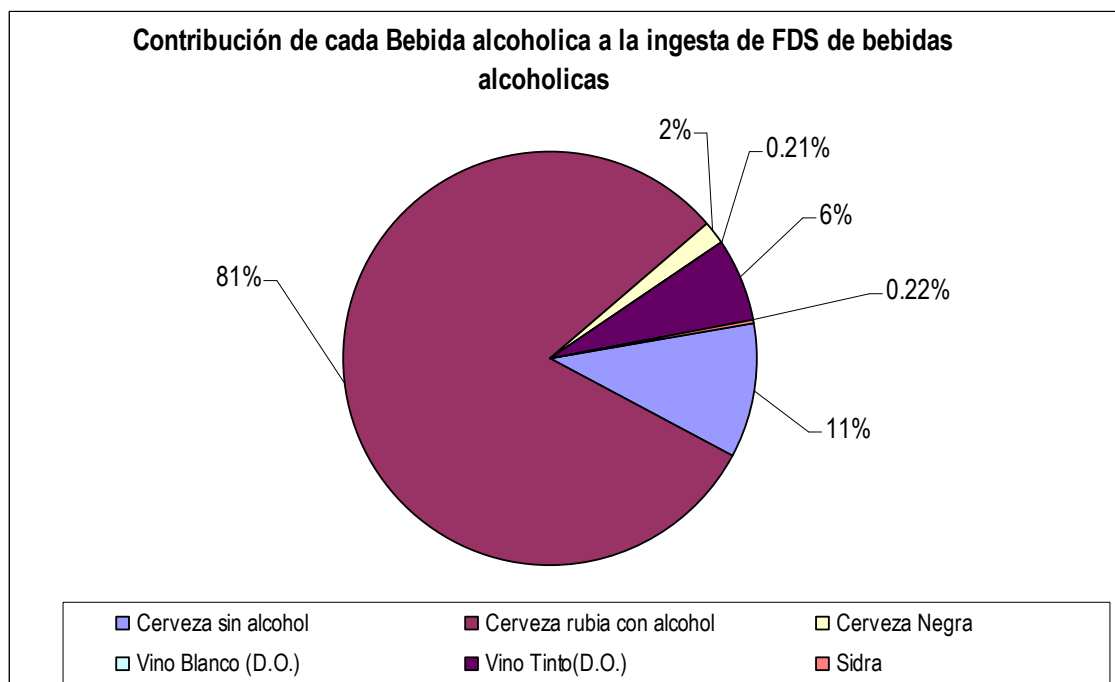


Figura 4. Aporte de cada bebida alcohólica a la FDS proveniente del grupo de bebidas con alcohol



La cerveza rubia con alcohol es la bebida alcohólica que contribuye en mayor medida (81%) a la ingesta de fibra dietética derivada de bebidas alcohólicas.

- **Complejo de fibra dietética soluble-polifenoles-proteína. Contribución a la dieta**

El concepto clásico y tradicional de Fibra dietética(Hipsley, 1953) incluye sólo una parte del total de sustancias no digeribles presentes en el alimento (los polisacáridos), sin embargo cómo se ha descrito en capítulos anteriores, en la definición actual de fibra (De Vries, 2004) se incluyen otros compuestos (proteína resistente a la hidrólisis, polifenoles...); de esta manera en esta memoria se ha empleado el término “complejo de fibra dietética” que incluye los polisacáridos no digeribles, proteína resistente, polifenoles asociados a los polisacáridos.

Considerando la concentración del complejo de fibra en las bebidas, la ingesta y contribución a la dieta, real de los compuestos no digeribles presentes en la bebida se muestra en la tabla 6.

De los datos mostrados en la tabla 6, se deduce un aumento de un 29% al comparar la ingesta de la fibra dietética (1.009 g/L) (entendida como polisacáridos no digeribles) con la ingesta del complejo de fibra(1.41g/L). Este aumento es provocado por la inclusión de la proteína resistente y los polifenoles asociados en el complejo.

Bajo un punto de vista nutricional y de salud, la importancia de considerar preferentemente la ingesta del complejo de fibra, frente a la fibra dietética (polisacáridos no digeribles), se centra en los efectos que estas uniones entre los polisacáridos no digeribles-polifenoles-proteína van a tener en la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos. Al llegar intactos al colon, estos polifenoles van a ser capaces de crear cierto estatus antioxidante y/o ser transformados en otros metabolitos por la flora intestinal (Spencer y col. 2000 ; Rechner y col. 2004).

Tabla 6. Complejo de fibra dietética soluble-polifenoles-proteína. Contribución a la dieta

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Polifenoles Asociados ^b (g/L)	Proteína no digerible ^c (g/L)	COMPLEJO (FDS-PP-PRT) ^d (g/L)	Ingesta ^e (mL/p/d)	COMPLEJO Ingesta ^f (g/p/d)
Zumos y Nectares Frutas/verduras	Manzana	1.67±0.01	0.0485±0.0009	0.035±0.008	1,73±0.01	0,54	0.0009
	Naranja comercial	0.79±0.01	0.155±0.002	0.099±0.001	1.044±0.01	10	0.0104
	Naranja natural	1.41±0.02	0.063±0.002	0.258±0.03	1.73±0.04	1,5	0.0026
	Naranja y soja	1.72±0.08	0.0733±0.0002	0.498±0.01	2.29±0.08	2,19	0.0050
	Piña	0.901±0.07	0.0451±0.001	0.026±0.003	0.97±0.07	11,42	0.0111
	Melocoton	2.37±0.06	0.180±0.004	0.054±0.001	2.60±0.06	10,85	0.0282
	Piña y uva	0.307±0.005	0.029±0.006	0.079±0.001	0.415±0.005	3,07	0.0013
	Melocoton y Uva	2.33±0.02	0.159±0.001	0.201±0.009	2.69±0.02	3,08	0.0083
	Mosto	0.356±0.006	0.095±0.001	0.0045±0.0009	0.456±0.006	3,09	0.0014
	Z.Tomate	4.126 ±0.1	0.139±0.003	0.201±0.004	4.47±0.10	2,2	0.0098
Total zumos y nectar		15.98±0.02	0.988±0.005	0.988±0.005	18.43±0.16	47,94	0.0791
Bebidas Alcoholicas	Cerveza sin alcohol	1.09±0.06	0.521±0.001	0.095±0.003	1.23±0.06	32	0.0396
	Cerveza rubia con alcohol	2.08±0.04	0.660±0.002	0.134±0.001	2.28±0.04	127	0.2896
	Cerveza negra	3.5±0.02	0.139±0.001	0.079±0.002	3.78±0.02	1,64	0.0061
	Vino Blanco	0.12±0.02	0.226±0.0002	0.025±0.002	0.16±0.02	5,6	0.0009
	Vino Tinto	1.4±0.002	0.890±0.01	0.3±0.003	2.59±0.02	14,8	0.0383
	Sidra	0.17±0.01	0.128±0.001	0.076±0.004	0.37±0.01	4,3	0.0016
Total bebidas alcoholicas		8.36±0.01	1.29±0.01	0.709±0.0065	10.37±0.08	185.34	0.3761

Tabla 6. (continuación)

Tipo de bebida		FDS ^a (g/l)	Polifenoles Asociados ^b (g/L)	Proteína no digerible ^c (g/L)	COMPLEJO (FDS-PP-PRT) ^d (g/L)	Ingesta ^e (mL/p/d)	COMPLEJO Ingesta ^f (g/p/d)
Café e Infusiones							0.00004
	Café soluble	7.5±0.04	1.05±0.02	0.52±0.0012	9.07±0.400	1,37	0.01243
	Poleo	0.156±0.002	0.208±0.002	0.0063±0.001	0.37±0.003	0,11	0.00004
	Manzanilla	0.078± 0.002	0.0318±0.0009	0	0.109±0.002	0,15	0.00002
Total café e infusiones		7.86±0.09 ₉	1.52±0.02	0.531±0.002	9.91±0.4	1,74	0.125
Refrescos y otros	Bebida de cacao	1.459±0.03	1.459±0.03	2.6±0.02	11.23±0.106	82	0.9207
	Bebida de cola	0.038±0.002	0.038±0.002	0.0021±0.0008	0.124±0.002	77,8	0.0097
	Bebida Isotonica	0.0024±0.0001	0.0024±0.0001	0.023±0.0005	0.045±0.0005	10,12	0.0004
	Refresco de naranja	0.24±0.005	0.0069±0.0003	0.085±0.001	0.332±0.005	31,8	0.0105
	Agua Tonica	0.02±0.0001	0.0051±0.0002	0	0.0251±0.0002	6,22	0.0002
	Horchata	1.004±0.009	0.334±0.001	0.51±0.002	1.84±0.009	1,125	0.0021
Total refrescos y otros		8.5380±0.09 ₉₉	1.85±0.03	3.22±0.02	13.59±0.106	209,065	0.9416
TOTAL		5.65±0.03	5.65±0.03	5.915±0.04	52.31±0.45	444,08	1.411

^aFibra dietética soluble (polisacáridos no digeribles)^bPolifenoles asociados en el complejo(expresado en g/Litro de bebida)^cProteína del complejo(expresado en g/Litro de bebida)^dFDS(polisacáridos no digeribles-polifenoles-proteína)^eConsumo diario de la bebida^fIngesta diaria del complejo

En Resumen

La conclusión más significativa es el hecho de que, basándonos en datos de consumo, las bebidas contribuyen de manera significativa a la ingesta de fibra dietética soluble (14.4%) y por tanto fibra dietética total (5.3%). Aunque también se debe ser cuidadoso con estos datos, puesto que estos valores dependen mucho de las bebidas ingeridas (existe una gran variabilidad entre los contenidos de FDS de las diferentes bebidas).

El grupo de Bebidas que contribuye en mayor medida a la ingesta de fibra dietética soluble es el grupo de los refrescos y otros (59%), principalmente por la inclusión de la bebida de cacao en dicho grupo. EN cualquier caso es un dato favorable desde el punto de vista de aumento en la ingesta de fibra en la población adolescente, ya que este sector de población es el mayor consumidor de estas bebidas.

Es posible que los datos elaborados a partir de las raciones comerciales muestren valores más veraces. Por ejemplo, en un día normal un adulto puede consumir: Un zumo de naranja (200ml) (aporta 0.83% de FDS a la FDT) y un café (5.92% de contribución a la FDT) en el desayuno, después repartido entre la comida y la cena podría beber una copa de vino tinto D.O. (150ml, que aporta 1.1 % de FDS) y una cerveza (3.61%) , con lo que el 11.46% de la fibra consumida ese día sería por la ingesta de estas bebidas, que como se puede ver son raciones aceptables para un hombre adulto a diario.

La contribución de las bebidas a la ingesta de fibra no se debe despreciar, no solo porque supone un incremento en la ingesta diaria de fibra, sino por el hecho de que en la mayoría de los casos no son “fibras normales”. Estas fibras poseen compuestos fenólicos asociados que aportan propiedades antioxidantes a estas fibras. En definitiva las bebidas poseen cantidades significativas de Fibra dietética antioxidante que ejercerán una doble acción en el organismo, a la acción propia de la fibra soluble se le añade el status antioxidante beneficioso que se generará en el colón.

Bajo un punto de vista nutricional y de salud, es cualitativamente y cuantitativamente más importante considerar preferentemente la ingesta del complejo de fibra (1.41g/L), frente a la fibra dietética (polisacáridos no digeribles)(1.009 g/L). Debido al efecto que las uniones de los polisacáridos con los polifenoles van a tener sobre la biodisponibilidad de éstos últimos.

CONCLUSIONES

Tras analizar conjunta y globalmente los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones finales:

1º La utilización de la técnica de diálisis en lugar de la habitual precipitación en medio etanólico, utilizada en los métodos comunes de análisis, permite determinar el contenido y composición de fibra dietética en bebidas.

2º Con la metodología en esta tesis se puede obtener la fibra como solución ó como materia sólida, lo cual permite posteriores análisis químicos y estructurales de la misma, así como ensayos de propiedades biológicas como fermentación colónica e interacciones con la microbiota intestinal

3º El vino contiene apreciables cantidades de fibra dietética soluble (entendida como polisacáridos no digeribles) (0.2-1.4 g/L) con cantidades significativas de polifenoles asociados

4º Los polifenoles asociados a la fibra del vino no se detectan por las técnicas habituales de CLAE ó HPLC, por lo que son ignorados en la mayor parte de la literatura científica. No obstante pueden representar hasta el 60% de los polifenoles del vino y tener papel importante en biodisponibilidad de este tipo de compuestos

5º La fibra dietética en cerveza (1.23-3.78 g/L) aparece como un complejo de polisacáridos no digeribles- polifenoles asociados-proteína resistente en proporciones aproximadas de 91:3:6., dependiendo del tipo de cerveza.

6º El café en grano presenta un alto contenido en fibra dietética (71.4%) y como consecuencia de ello y de las condiciones (presión, temperatura) de preparación de café, esta bebida presenta un contenido de fibra dietética muy superior al de bebidas alcohólicas y otras infusiones. Igualmente presenta cantidades significativas de polifenoles y proteína asociada.

7º Por primera vez se aportan datos de contenido en fibra dietética de la mayor partes de las bebidas habituales en la dieta. Presentan concentraciones de fibra muy variables que oscilan desde 0.078 g/L de la infusión de poleo hasta 7.5 g/L del café

8º La cantidad de fibra en refrescos es despreciable

9º La hidrólisis de la fibra dietética soluble (complejo) con celulasa libera compuestos fenólicos en cantidades variables, lo que parece evidenciar la presencia de estos compuestos en la matriz de fibra no accesibles a enzimas digestivos

10º La posible presencia de compuestos de Maillard entre los constituyentes de algunos complejos de fibra (especialmente cerveza negra y café) puede aportar información sobre la composición de los componentes de la fibra y explicar algunos valores de capacidad antioxidante. Ello debería ser objetivo de futura investigación.

11º La fermentación colónica in vitro de la fibra dietética soluble de 3 bebidas (na alcohólica, una infusión y un zumo) presentan valores menores que los correspondientes a polisacáridos no digeribles solubles. La presencia de polifenoles y proteína asociados a este tipo de fibras puede ser la causa de esta menor fermentabilidad

12º Las bebidas de la dieta española aportan una cantidad de fibra estimada en 1.4 g/p/día. Ello supone un incremento del 22% de fibra dietética soluble y 7.7% en la fibra insoluble, con respecto a los datos publicados en la literatura.

13º La fibra de las bebidas parece actuar como un importante transportador de compuestos polifenólicos bioactivos antioxidantes a lo largo del tracto gastrointestinal

14º Este trabajo señala como próximas líneas de trabajo la determinación de la estructura y tipos de unión entre las macromoléculas y compuestos específicos que integran el complejo fracción indigerible, así como el estudio de sus potenciales propiedades biológicas (efectos antimicrobianos, antimutagénicos, prebióticos, metabolitos derivados de fermentación)

ANEXO I COMPLEJO DE FIBRA DIETICA SOLUBLE LIOFILIZADO.
DETERMINACIÓN GRAVIMÉTRICA..

Del mismo modo que otros métodos oficiales de determinación de fibra, cuantifican la fibra gravimetricamente, en este trabajo se ha intentado (con éxito) la cuantificación del complejo de fibra dietética soluble. Para ello el método se resume en tres etapas: (figuar1)

1.Concentración de la disolucion del complejo de fibra dietética soluble(obtenida tras los tratamientos enzimáticos y el proceso de diálisis). Se eliminó la mayor cantidad posible da agua, para facilitar el siguiente paso.

2.Liofilizar la disolución anterioermente cocentrada (durante 3 días).

3.Finalmente se determina gravimetricamente el complejo (pesando los complejos de FDS, ya en estado sólido., empleando una balanza analítica)

De esta manera se trató de comparar de alguna manera los resultados gravimétricos con los resultados espectrofotométricos, resultantes de la suma de la FD (polisacáridos), compuestos fenólicos, y proteína soluble (tabla 1).

Los resultados presentados en la tabla demuestran una clara similitud, es decir son equiparables, puesto que en todos los casos los valores gravimétricos son iguales o mayores a los espectrofotométricos. La diferencia entre ambos resultados podria explicarse por la presencia de otro compuestos minoritarios (minerales, carotenoides) en el complejo de fibra .

Figura 1 Proceso para obtener el complejo de FDS en estado sólido

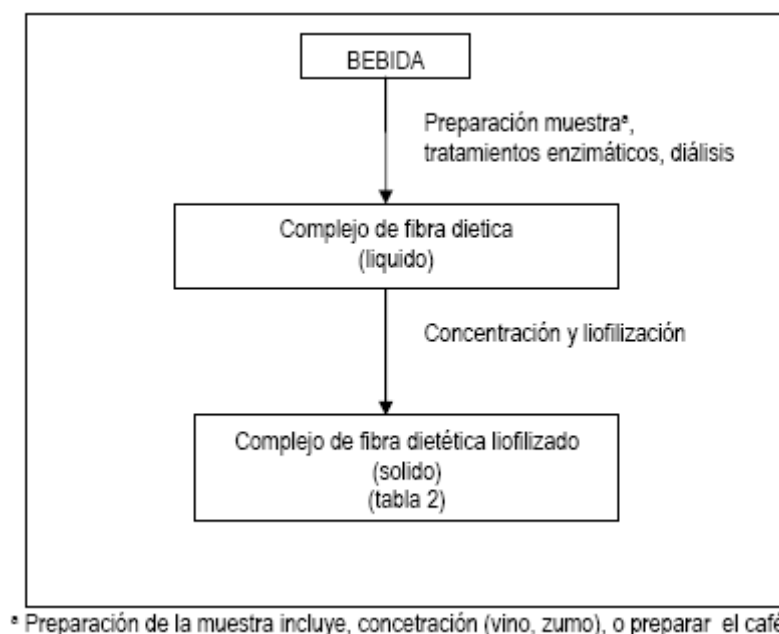
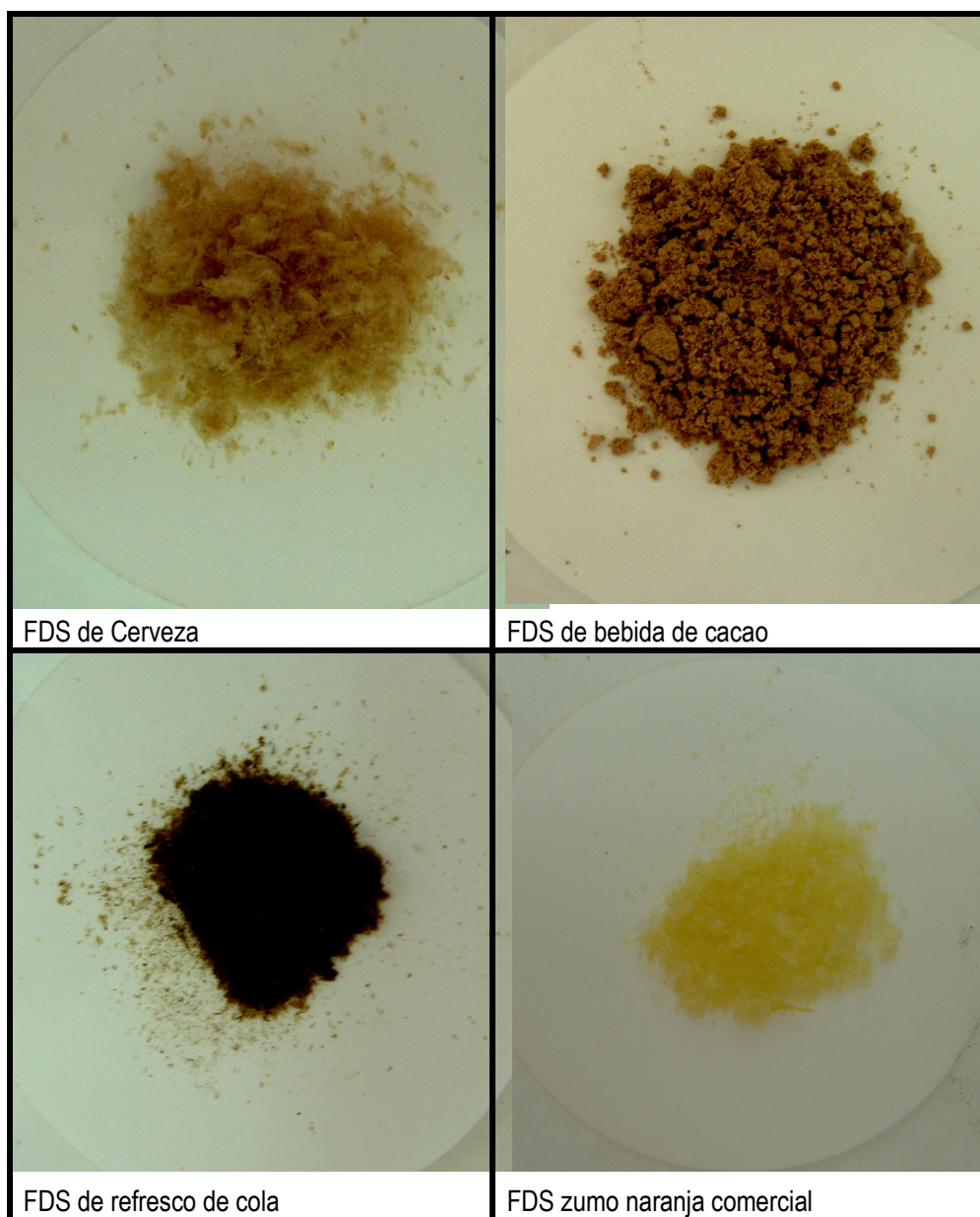


Tabla 1 Comparación de resultados gravimétricos y espectrofotométricos del complejo de fibra dietética soluble de las bebidas

BEBIDA	GRAVIMETRICAMENTE ^a (g de complejo FDS en1L)	ESPECTROFOTOMETRICAMENTE (g complejo FDS/L)
ZUMOS		
Manzana	1.84	1.75
Naranja comercial	1.20	1.04
Naranja natural	1.77	1.73
Naranja y soja	3.65	2.29
Piña	1.06	0.97
Melocoton	2.75	2.60
Piña y uva	0.54	0.41
Melocoton y Uva	2.92	2.70
Mosto	0.65	0.46
Z.Tomate	4.69	4.46
BEBIDAS ALCOHÓLICAS		
Cerveza sin alcohol	1.38	1.23
Cerveza	2.42	2.28
Vino Blanco	0.31	0.16
Vino Tinto	2.96	2.59
Sidra	0.39	0.37
INFUSIONES		
Te Rojo	0.69	0.35
Café soluble	9.35	9.04
Poleo	0.38	0.37
Manzanilla	0.27	0.11
REFRESCOS Y OTROS		
Horchata	3.38	1.84
Bebida de cacao	24.80	11.22
Refresco de cola	0.34	0.12
Bebida Isotonica	0.11	0.04
Refresco de Naranja	0.34	0.33
Agua tónica	0.19	0.02

^a Aplicando el factor de conversión necesario en cada muestra. Gramos de complejo que encontramos en un litro de bebida original

Las fotos que se muestran a continuación demuestran de manera “tangible” la existencia del complejo (Figura “).

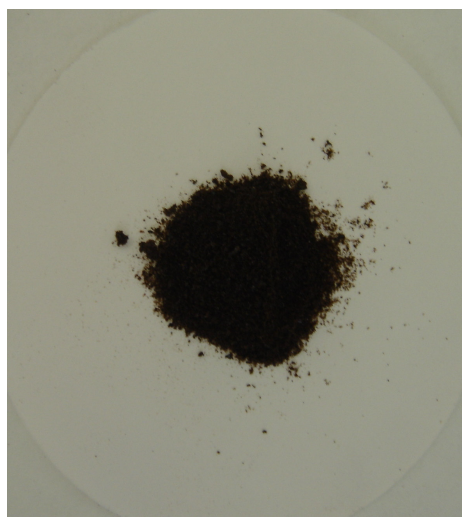




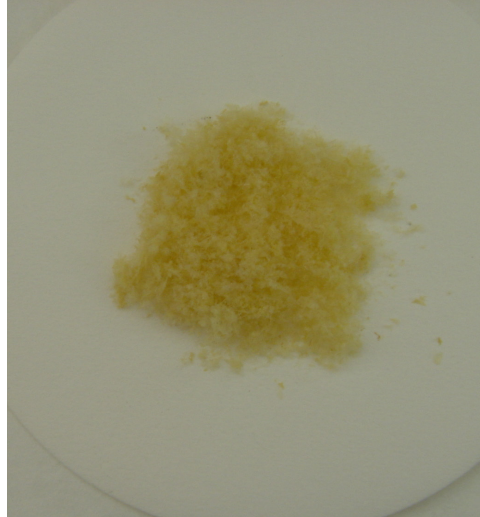
FDS de infusión de poleo



FDS de vino tinto



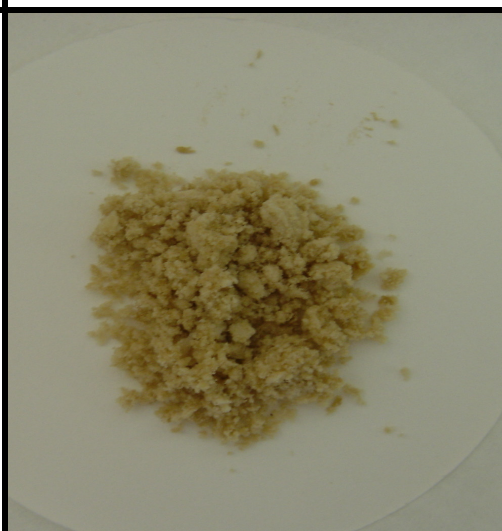
FDS de café soluble









FDS refresco de naranja








FDS infusión manzanilla



FDS de horchata

	
FDS de zumo de piña y uva	FDS de zumo de melocotón y uva
	
FDS de zumo de naranja natural	FDS de cerveza sin alcohol
	
FDS de mosto	FDS de zumo de manzana

	
FDS de zumo de melocotón	FDS de zumo de piña
	
FDS de zumo de naranja y soja	FDS de zumo de tomate
	
FDS de agua tónica	

ANEXO II. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

I. INTRODUCCION

Un microscopio electrónico de barrido (MEB, SEM) crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico .

En este tipo de técnica se hace incidir un delgado haz de electrones acelerados, con energías desde unos cientos de eV hasta unas decenas de keV (50 KeV), sobre una muestra gruesa, opaca a los electrones. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de la misma siguiendo una trayectoria de líneas paralelas.

La señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica para cada posición de la sonda. Las variaciones en la intensidad de la señal que se producen conforme la sonda barre la superficie de la muestra, se utilizan para variar la intensidad de la señal en un tubo de rayos catódicos que se desplaza en sincronía con la sonda. De esta forma existe una relación directa entre la posición del haz de electrones y la fluorescencia producida en el tubo de rayos catódicos. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 200.000 veces o más

Si la muestra no es buena conductora (como en nuestro caso) se acostumbra a recubrirla con una película conductora metálica o de carbono para evitar que ésta se cargue cuando sea irradiada.

II. MATERIALES Y METODOS

1. Muestras

Sustancias usadas como patrones:

- Pectinas de cítricos (patron de fibra soluble pura)(76280, Fluka)
- Celulosa (patron de fibra insoluble pura)(C-8002, Sigma)
- Taninos condensados (empelado como patrón de compuesto fenólico puro):taninos puros de algarroba mediterránea (90% de riqueza según control de calidad de la empresa). Nestec, S.A. Vevey, Suiza

Muestras:

- Complejo de FDS aislado y liofilizado de infusión de café.

- Complejo de FDS aislado y liofilizado de Cerveza con alcohol.
- Complejo de FDS aislado y liofilizado de vino tinto
- Complejo de FDS aislado y liofilizado de zumo de naranja comercial.

2. Material.

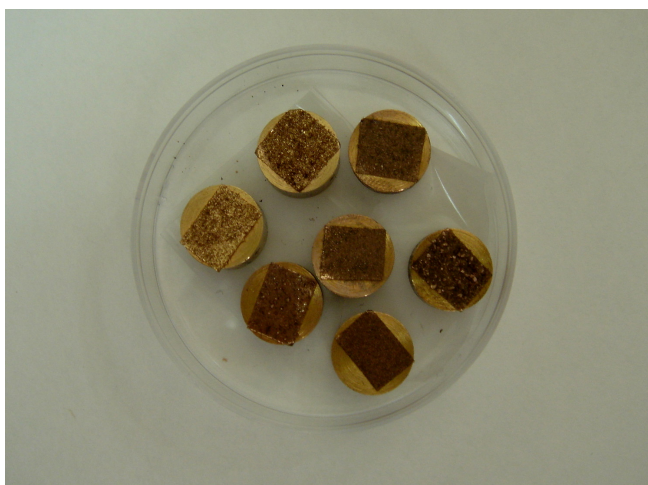
- Porta muestras de Laton.
- Lamina de Cobre (puede ser de carbon pero como se va ha hacer después microanálisis se usa Au que produce menos interferencias).
- Microscopio electrónico de barrido de 30kV de emisión de campo JEOL 6330 F, con una resolución de 12Å y dotado de sistema de microanálisis (XEDS.).
- Metalizadora Emitech K 550X., para metalizar la muestra con oro

3. Procedimiento Experimental

Preparación de la muestra(hacerla conductora): Sobre un portamuestras de Laton se coloca una pequeña lámina de Cobre; sobre ésta se espolvorea la muestra debidamente molida y perfectamente seca. El siguiente paso consiste en colocar la muestras en la metalizadora, que la metalizara con Oro, para hacer la muestra conductora (no se emplea carbono puesto que en nuestro caso vamos a analizar compuestos ricos en carbono, y su empleo podría interferir la señal). Las condiciones del proceso de metalización son 3 minutos a 24mA.

Una vez que ya se tienen las muestras(figura 1), se guardan en un desecador hasta que se realice la medida con el microscopio electrónico de barrido.

Figura 1. Muestras preparadas para ser analizadas en el microscopio de barrido.

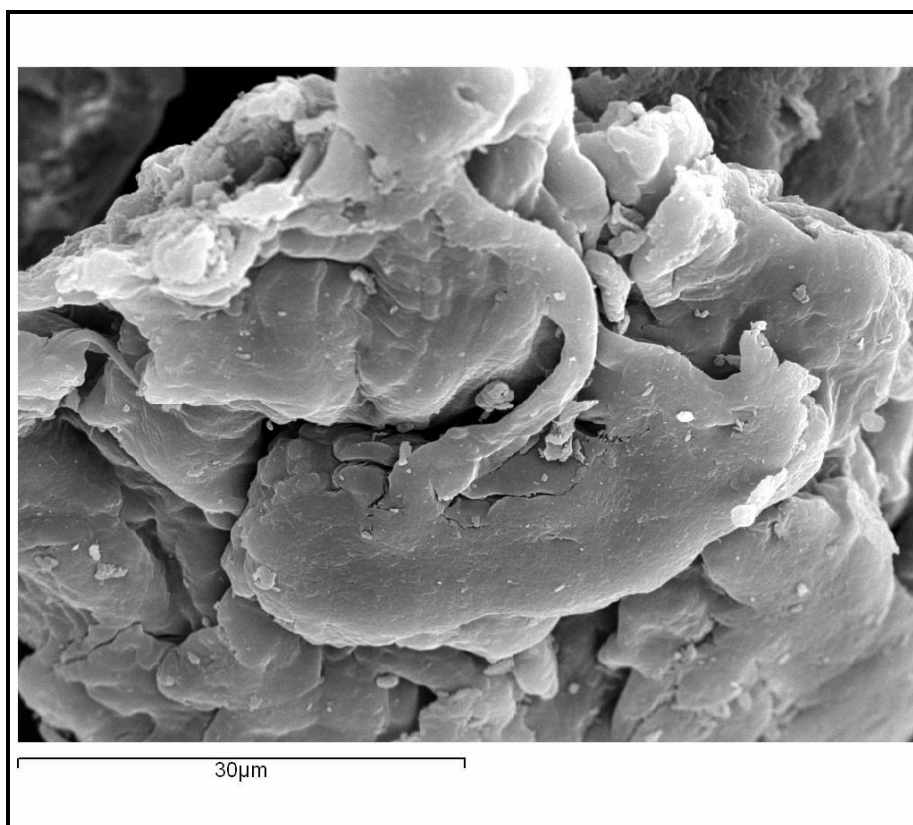


III. RESULTADOS.

Debido a la dificultad que entrañó el proceso de obtención del complejo debidamente liofilizado, aunque aparentemente las muestras no presentaban restos de agua, el microscopio electrónico fue capaz de detectar cierta cantidad de humedad, lo que dificultó la realización de ciertas fotografías a determinados aumentos. Es por esta causa que no todas las fotos se pudieron tomar aplicando el mismo número de aumentos.

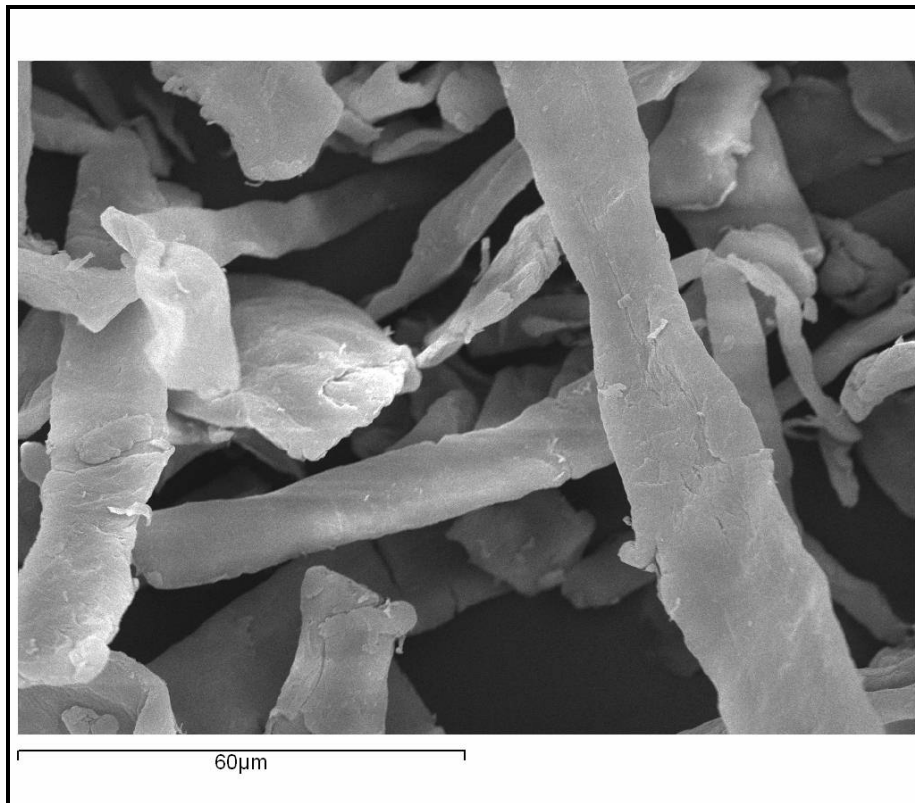
A continuación se presentan las diversas fotos tomadas; en general, si se comparan las fotos realizadas utilizando técnicas de microscopia electrónica de barrido (SEM) de este complejo con las realizadas de fibras solubles puras (pectinas de cítricos), tan solo se ve se ve cierta similitud, por el componente de solubilidad de la fibra, algo que ni siquiera se aprecia cuando se compara con fibras insolubles (como celulosa). Sin embargo si se compara con otras fibras que poseen polifenoles asociados se pueden observar mayores puntos en común que con las pectinas.

1. PATRON Fibras solubles puras. Foto 1 . Pectinas X 2000

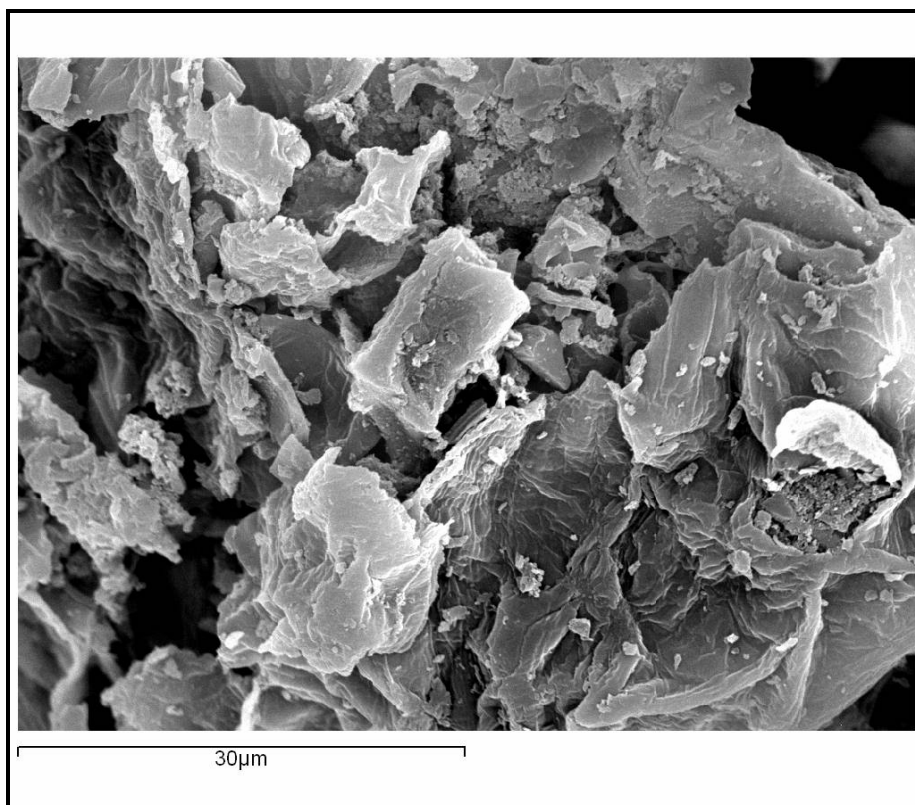


Aunque la escala es diferente, las diferencias estructurales entre las pectinas y la celulosa son claras. Mientras que el foto de las pectinas se aprecia una estructura mas globular, en la foto realizada sobre la muestra de celulosa se observa mas claramente un conjunto de fibras similares a papel.

2. Patron de Fibra Insoluble. Foto 2 . Celulosa. X 1000



3. Patron de Compuestos Fenólicos puros. Foto 3. Taninos condensados X 2000



5. Muestras

Foto 4. Complejo de fibra dietética soluble en Cerveza. 100 X

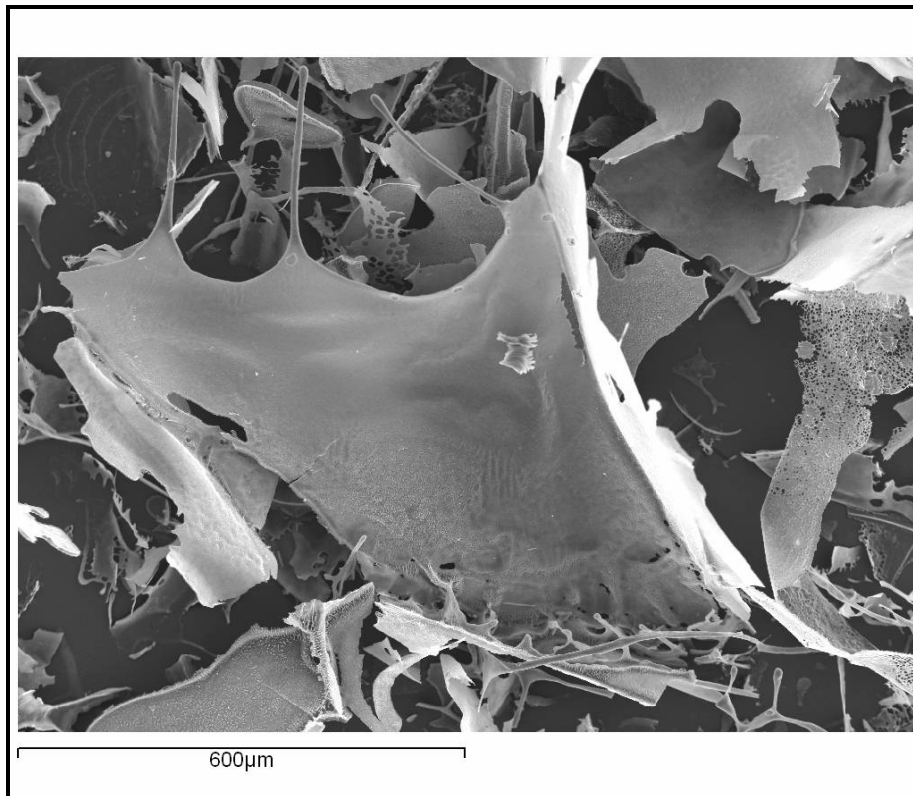


Foto 5. Complejo de fibra dietética soluble en Cerveza. 300 X

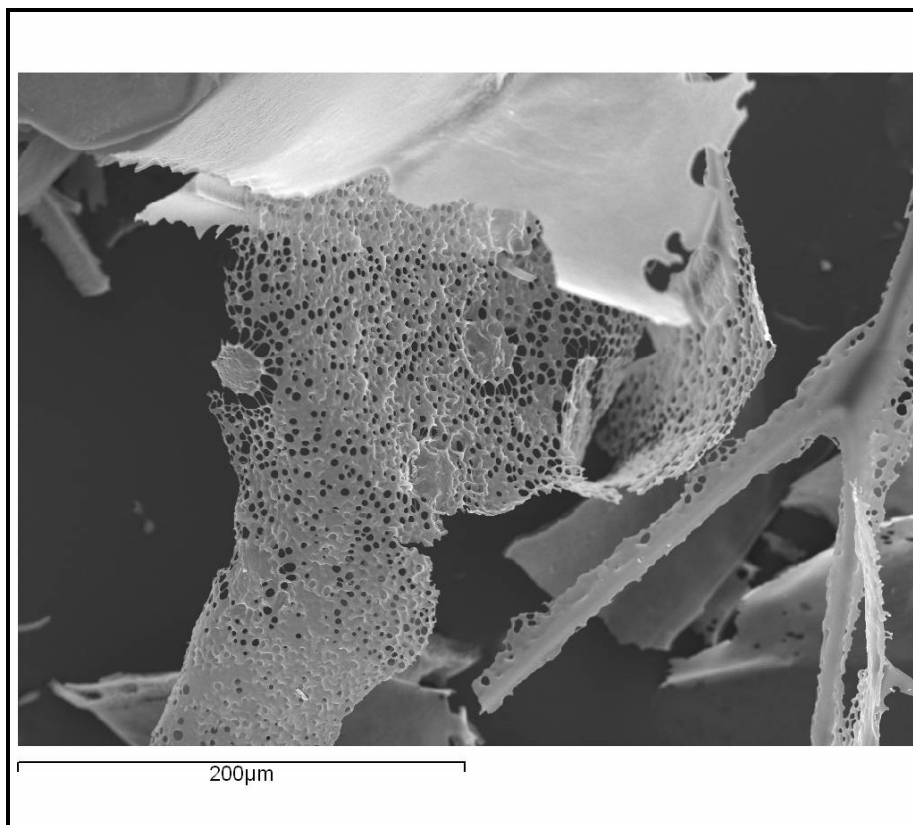


Foto 6. Complejo de fibra dietética soluble en bebida de café instantáneo. 250 X

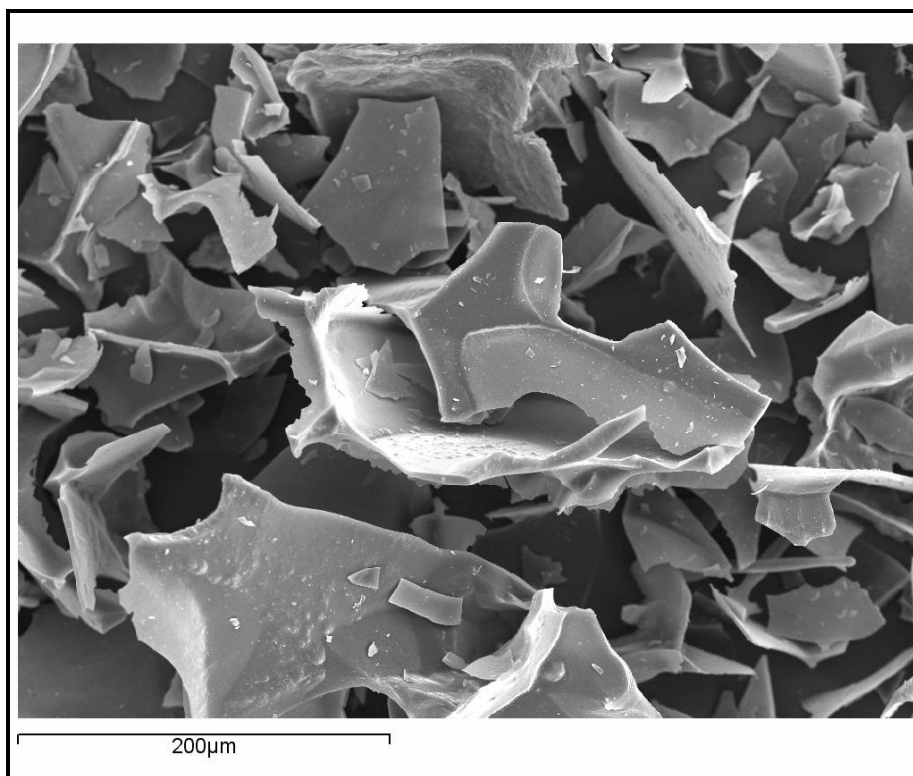
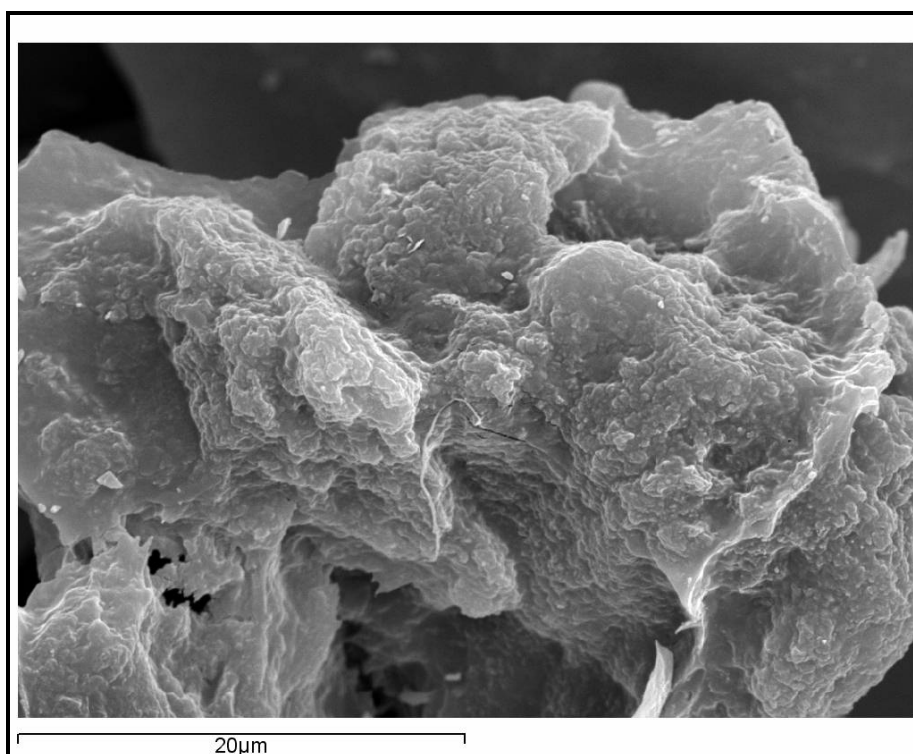


Foto 7. Complejo de fibra dietética soluble en bebida de café instantáneo. 3000 X



Entre la foto Foto 7. y la foto tomada al patron de taninos condensados se aprecia cierta similitud estructural, posiblemente debido a la elevada presencia de compuestos fenólicos asociado en el complejo de fibra dietética soluble del café.

Foto 8. Complejo de fibra dietética soluble en vino tinto. 250 X

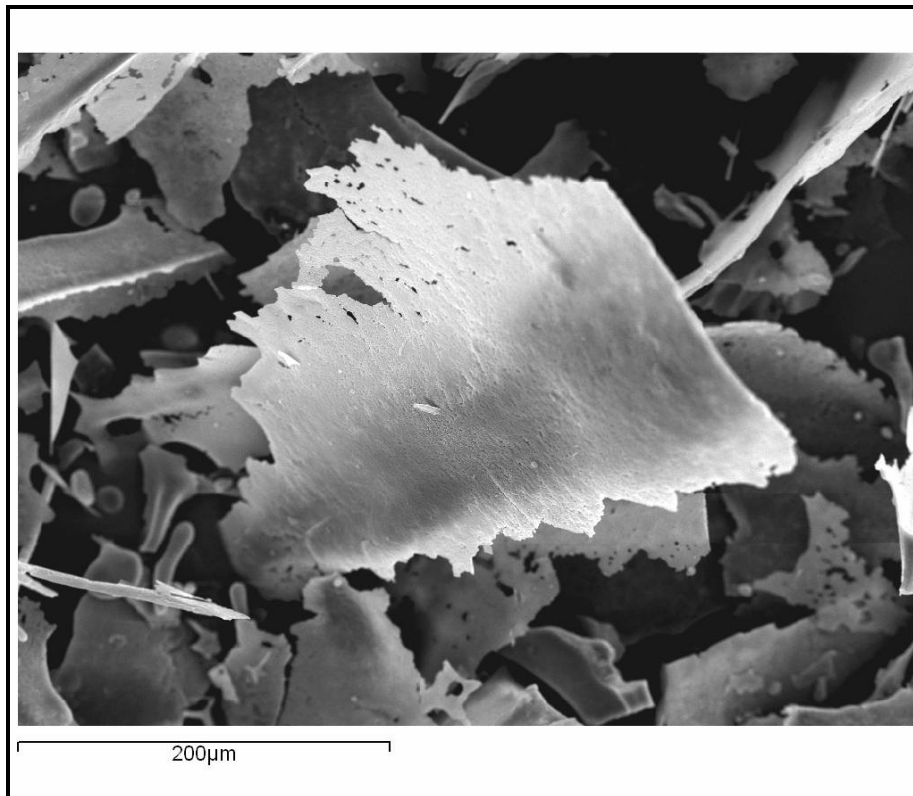


Foto 9. Complejo de fibra dietética soluble en vino tinto. 5000 X

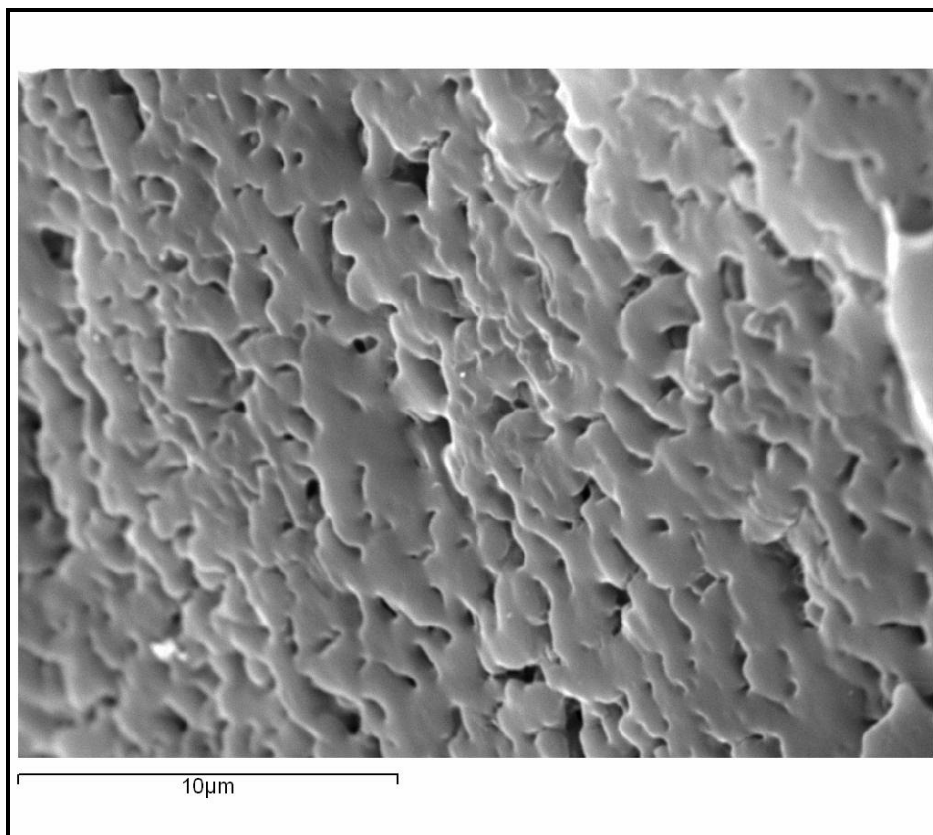


Foto 10. Complejo de fibra dietética soluble en zumo de naranja comercial. 250 X

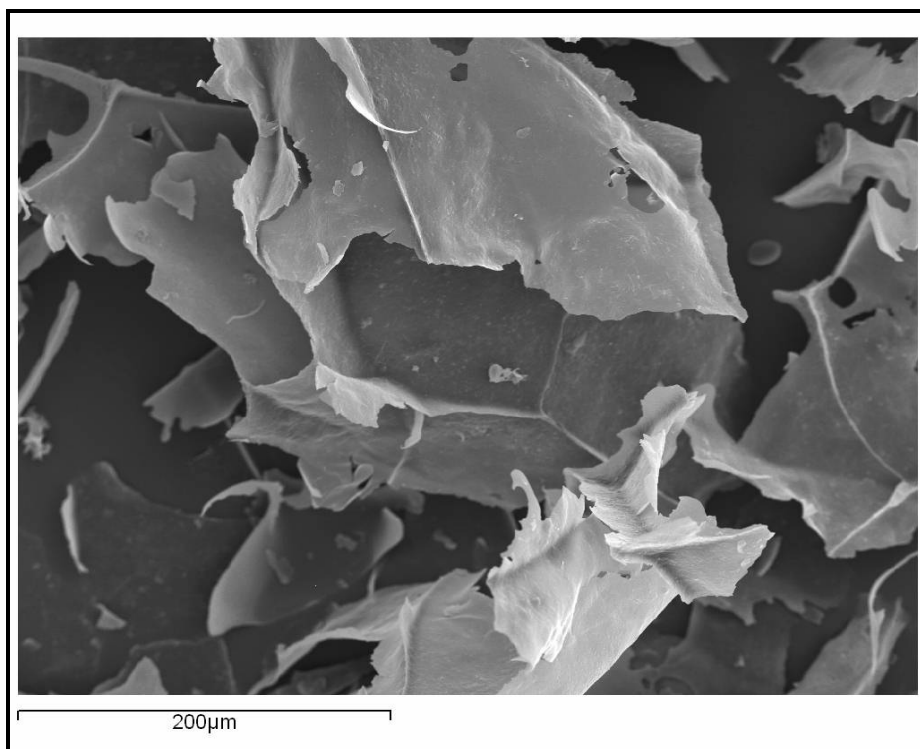
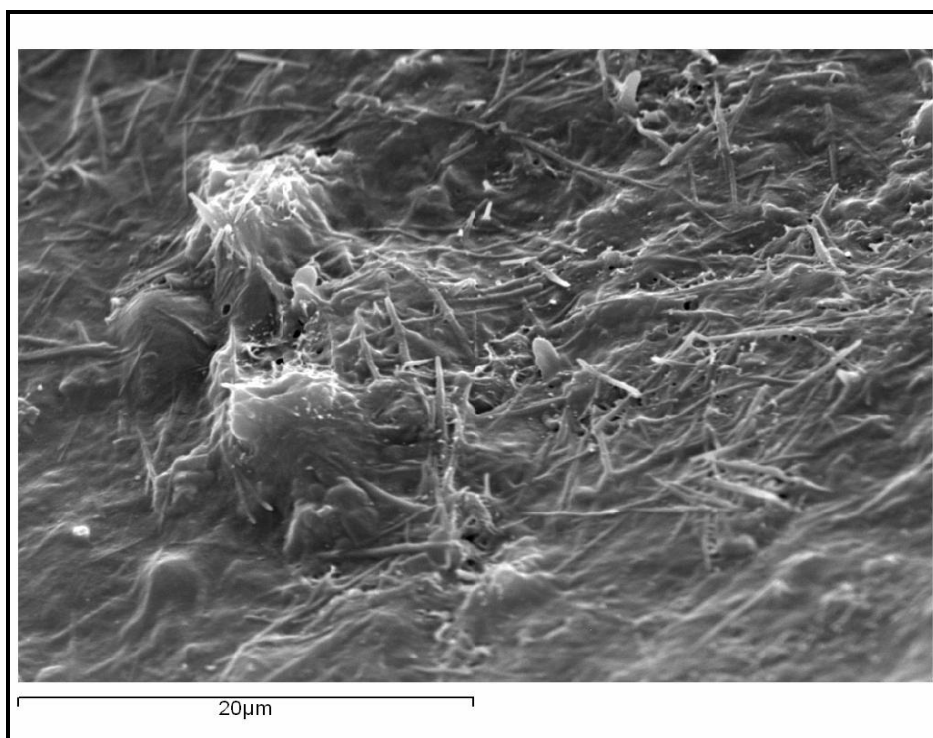


Foto 11. Complejo de fibra dietética soluble en zumo de naranja comercial. 3000 X



Se observa similitud al comparar la fotos del complejo de fibra en zumo de naranja, vino y café, mientras que con respecto a la cerveza la diferencia es mayor, posiblemente debido no solo al tipo y porcentaje de compuestos fenólicos, sino también al tipo de polisacárido predominante en estos complejos.

BIBLIOGRAFIA

- Abecia-Soria, L., Pezoa-García, N. H., & Amaya-Farfan, J. (2005). Soluble albumin and biological value of protein in cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans as a function of roasting time. *Journal of Food Science*, 70(4)
- Adil, I. H., Çetin, H. I., Yener, M. E., & Bayindirli, A. (2007). Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 43(1), 55-63.
- Al-Assaf, S., Katayama, T., Phillips, G. O., Sasaki, Y., & Williams, P. A. (2003). Quality control of gum arabic. *Foods & Food Ingred. J. Jpn.*, 208(10), 771-780.
- Al-Assaf, S., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2005). Studies on acacia exudate gums. Part I: The molecular weight of Acacia senegal gum exudate. *Food Hydrocolloids*, 19(4), 647-660.
- Aldoori, W., & Ryan-Harshman, M. (2002). Preventing diverticular disease. Review of recent evidence on high-fibre diets. *Canadian Family Physician*, 48(OCT.), 1632-1637.
- Alimentación en Españã, L. (2002). *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*,
- Alkhalaf, M. (2007). Resveratrol-induced apoptosis is associated with activation of p53 and inhibition of protein translation in T47D human breast cancer cells. *Pharmacology*, 80(2-3), 134-143.
- Almeida, C., Duarte, I. F., Barros, A., Rodrigues, J., Spraul, M., & Gil, A. M. (2006). Composition of beer by 1H NMR spectroscopy: Effects of brewing site and date of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 700-706.
- Alonso García, A., Cancho Grande, B., & Simal Gándara, J. (2004). Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 175-180.
- Andersson, R., Westerlund, E., & Åman, P. (1994). Natural Variations in the Contents of Structural Elements of Water-extractable Non-starch Polysaccharides in White Flour. *Journal of Cereal Science*, 19(1), 77-82.
- Andreasen, M. F., Christensen, L. P., Meyer, A. S., & Hansen, A. (2000). Content of phenolic acids and ferulic acid dehydrodimers in 17 rye (*Secale cereale* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2837-2842.
- Andreotti, C., Costa, G., & Ragaini, A. (2006). Phenolic compounds characterisation of peaches and nectarines. *Acta Horticulturae*, 713, 449-452.
- Andriot, I., Le Queré, J. -, & Guichard, E. (2004). Interactions between coffee melanoidins and flavour compounds: Impact of freeze-drying (method and time) and roasting degree of coffee on melanoidins retention capacity. *Food Chemistry*, 85(2), 289-294.
- Arthington, J.D. and Brown, W.F. Estimation of feeding value of four tropical forage species at two stages of maturity. *J. Anim. Sci.* **2005**, 83, 1726-1731.

- Asano, I., Hamaguchi, K., Fujii, S., & Iino, H. (2003). In vitro digestibility and fermentation of mannoooligosaccharides from coffee mannan. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 62-66.
- Asp, N. -. (1987). Dietary fibre - Definition, chemistry and analytical determination. *Molecular Aspects of Medicine*, 9(1), 17-29.
- Asp, N. -, Johansson, C. -, Hallmer, H., & Siljeström, M. (1983). Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(3), 476-482.
- Aura, A. -. et al. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1725-1730.
- Ayestarañ, B., Guadalupe, Z., & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29-39.
- Bacic, A., Du, H., Stone, B. A., & Clarke, A. E. (1996). Arabinogalactan proteins: A family of cell-surface and extracellular matrix plant proteoglycans. *Essays in Biochemistry*, 31, 91-101.
- Bacic, A., & Stone, B. A. (1981). Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.*, 8, 475-495.
- Baldini, V. L. S., Iadéroza, M., Ferreira, E. A. H., Sales, A. M., Draetta-Idos, S., & Giacomelli, E. J. (1993). Occurrence of bromelain in species and cultivars of pineapple plants. *Coletanea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, 23, 44-55.
- Balentine, D. A. (1992). Manufacturing and chemistry of tea. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, Antioxidants and Cancer Prevention*,
- Bamforth, C. W. (2002). Nutritional aspects of beer - A review. *Nutrition Research*, 22(1-2), 227-237.
- Bamforth, C. W. (1999). Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(3), 81-90.
- Bamforth, C. W., & Gambill, S. C. (2007). Fiber and putative prebiotics in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(2), 67-69.
- Baral, R. N., & Maity, P. (1992). Induction of colorectal cancer in rats by 20-methylcholanthrene. *Cancer Letters*, 61(2), 177-183.
- Barry, J. L. et al. (1995). Estimation of the fermentability of dietary fibre in vitro: a European interlaboratory study. *The British journal of nutrition*, 74(3), 303-322.
- Bartolome, A., Ruperez, P., & Prieto, A. (1995). Polysaccharides from the Cell Walls of Pineapple Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 608-612.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., & Namba, T. (1996). Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1479-1484.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., & Namba, T. (1996). Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(4), 655-657.

- Battaglia, M. et al. (2007). Proline-rich cell wall proteins accumulate in growing regions and phloem tissue in response to water deficit in common bean seedlings. *Planta*, 225(5), 1121-1133.
- Bekedam, E. K., DeLaat, M. P. F. C., Schols, H. A., VanBoekel, M. A. J. S., & Smit, G. (2007). Arabinogalactan Proteins Are Incorporated in Negatively Charged Coffee Brew Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 761-768.
- Bekedam, E. K., Schols, H. A., vanBoekel, M. A. J. S., & Smit, G. (2006). High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7658-7666.
- Belajova, E., & Suhaj, M. (2004). Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 86(3), 339-343.
- Belitz, H. -, Grosch, W., & Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry Third Revised Edition*, .
- Bengoechea, M. L., Sancho, A. I., Bartolome, B., Estrella, I., Gómez-Cordoves, C., & Hernández, M. T. (1997). Phenolic Composition of Industrially Manufactured Purees and Concentrates from Peach and Apple Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4071-4075.
- Bertoft, E., & Manelius, R. (1992). A method for the study of the enzymic hydrolysis of starch granules. *Carbohydrate Research*, 227, 269-283.
- Bertoft, E., Manelius, R., Myllärinen, P., & Schulman, A. H. (2000). Characterisation of Dextrins Solubilised by α -Amylase from Barley Starch Granules. *Starch/Staerke*, 52(5), 160-163.
- Bingham, S. A. et al. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): An observational study. *Lancet*, 361(9368), 1496-1501.
- Blanco-Gomis, D., Mangas-Alonso, J. J., Junco-Corujedo, S., & Gutiérrez-Alvarez, M. D. (2007). Cider proteins and foam characteristics: A contribution to their characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(7), 2526-2531.
- Bonita, J., Mandarano, M., Shuta, D., & Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55(3), 187-198.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J. -, Duthie, G. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2007). The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6), 714-725.
- Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., & Fogliano, V. (2002). Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6527-6533.
- Bosaeus, I. (2004). Fibre effects on intestinal functions (diarrhoea, constipation and irritable bowel syndrome). *Clinical Nutrition, Supplement*, 1(2), 33-38.
- Boulet, J. C., Williams, P., & Doco, T. (2007). A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 79-85.

- Bradbury, A. G. W., & Halliday, D. J. (1990). Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(2), 389-392.
- Bradford, M.M. (1976) .A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brandelli, A., & Lopes, C. H. G. L. (2005). Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *Journal of Food Biochemistry*, 29(6), 624-637.
- Bravi, E., Perretti, G., Montanari, L., Favati, F., & Fantozzi, P. (2007). Supercritical fluid extraction for quality control in beer industry. *Journal of Supercritical Fluids*, 42(3 SPEC. ISS.), 342-346.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333.
- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481-1487.
- Brillouet, J. -, Bosso, C., & Moutounet, M. (1990). Isolation, purification, and characterization of an arabinogalactan from a red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 29-36.
- Brillouet, J. -, Williams, P., Will, F., Müller, G., & Pellerin, P. (1996). Structural characterization of an apple juice arabinogalactan-protein which aggregates following enzymic dearabinylation. *Carbohydrate Polymers*, 29(3), 271-275.
- Bunko, K., & Kennedy, J. F. (2007). H. Nursten, The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications, RSC Publishing, Cambridge, UK (2005) xii + 214 pp., Price: £89.95, ISBN: 0-85404-964-9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(3), 358.
- Burda, S., Oleszek, W., & Lee, C. (1990). Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 945-948.
- Burkitt, D. (1991). An approach to the reduction of the most common western cancers. The failure of therapy to reduce disease. *Archives of Surgery*, 126(3), 345-347.
- Burkitt, D. P. (1988). Dietary fiber and cancer. *Journal of Nutrition*, 118(4), 531-533.
- Butt, M. S., Shahzadi, N., Sharif, M. K., & Nasir, M. (2007). Guar gum: A miracle therapy for hypercholesterolemia, hyperglycemia and obesity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(4), 389-396.
- Callemien, D., Jerkovic, V., Rozenberg, R., & Collin, S. (2005). Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 424-429.
- Cämmerer, B., Jalyshko, W., & Kroh, L. W. (2002). Intact carbohydrate structures as part of the melanoidin skeleton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2083-2087.

- Carneiro, L., dosSantosSa, I., dosSantosGomes, F., Matta, V., & Cabral, L. (2002). Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination*, 148(1-3), 93-98.
- Castillo-Villanueva, A. et al. (2007). Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. *escumite*: Chemical Characterization, Sugar Specificity, and Effect on Human T-Lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5781-5787.
- Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2006). The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science*, 44(2), 203-211.
- Chen, H., Zhang, M., Qu, Z., & Xie, B. (2007). Compositional analysis and preliminary toxicological evaluation of a tea polysaccharide conjugate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2256-2260.
- Chen, H., Zhang, M., & Xie, B. (2004). Quantification of uronic acids in tea polysaccharide conjugates and their antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3333-3336.
- Clarke, A. E., Anderson, R. L., & Stone, B. A. (1979). Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. *Phytochemistry*, 18(4), 521-540.
- Clifford, M. N. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1033-1043.
- Clifford, M. N. (1985). The composition of green and roasted coffee beans. *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*,
- Clifford, M. N., Knight, S., Surucu, B., & Kuhnert, N. (2006). Characterization by LC-MSn of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: Dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl- dimethoxycinnamoylquinic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 1957-1969.
- Clifford, M. N., & Ramirez-Martinez, J. R. (1991). Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*, 40(2), 191-200.
- Coenen, G. J., Bakx, E. J., Verhoef, R. P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers*, 70(2), 224-235.
- Coghe, S., Adriaenssens, B., Leonard, S., & Delvaux, F. R. (2004). Fractionation of colored maillard reaction products from dark specialty malts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 62(2), 79-86.
- Correa García, S., & Buzaleh, A. M. (2007). Polyphenoloxidase: An enzyme widespread in fruits. *Biochemical Education*, , 152-153.
- Cortacero-Ramírez, S., Hernáinz-Bermudez, De Castro, M., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., & Fernández-Gutiérrez, A. (2003). Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(7-8), 440-445.

- Cortés, C., Esteve, M. J., Frígola, A., & Torregrosa, F. (2005). Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. *Food Chemistry*, 91(2), 319-325.
- Cortés, C., Esteve, M. J., Frígola, A., & Torregrosa, F. (2004). Physical and chemical properties of different commercially available types of "horchata de chufa". *Italian Journal of Food Science*, 16(1), 113-121.
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., & Collin, S. (2002). Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2385-2391.
- Cummings, J. H. (1984). Colonic absorption: the importance of short chain fatty acids in man. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, 93, 89-99.
- Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 21(6), 357-365.
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Draser, B. S. (1989). The gut microflora and its significance. *Gastrointestinal and Oesophageal Pathology*, , 201-219.
- Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227.
- Cunningham, E., & Marcason, W. (2002). What Role Does Fiber Play in Diverticular Disease? *Journal of the American Dietetic Association*, 102(2), 225.
- Curioni, A., Pressi, G., Furegon, L., & Peruffo, A. D. B. (1995). Major proteins of beer and their precursors in barley: Electrophoretic and immunological studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(10), 2620-2626.
- Cyran, M., Izydorczyk, M. S., & MacGregor, A. W. (2002). Structural characteristics of water-extractable nonstarch polysaccharides from barley malt. *Cereal Chemistry*, 79(3), 359-366.
- Das, S., Santani, D. D., & Dhalla, N. S. (2007). Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Experimental and Clinical Cardiology*, 12(1), 5-10.
- De Beer, D. et al. (2004). Phenolics: A comparison of diverse analytical methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 389-400.
- De Brito, E. S., Narain, N., Pezoa García, N. H., Valente, A. L. P., & Pini, G. F. (2002). Effect of glucose and glycine addition to cocoa mass before roasting on Maillard precursor consumption and pyrazine formation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(5), 534-537.
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81(4), 503-509.
- DeGaetano, G., DiCastellnuovo, A., & Rotondo, S. (2005). Cardiovascular protective effect of moderate wine consumption: Evidence after the French Paradox. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 17(1), 47-60.
- Delcour, J. A., Van Win, H., & Grobet, P. J. (1999). Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 271-275.

- Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63(4), 593-602.
- DeMarino, S. et al. (2007). Phenolic glycosides from *Foeniculum vulgare* fruit and evaluation of antioxidative activity. *Phytochemistry*, 68(13), 1805-1812.
- Deprez, S. et al. (2000). Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition*, 130(11), 2733-2738.
- Dervilly, G., Leclercq, C., Zimmermann, D., Roue, C., Thibault, J. -, & Saulnier, L. (2002). Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate Polymers*, 47(2), 143-149.
- Dervilly, G., Saulnier, L., Roger, P., & Thibault, J. -. (2000). Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 270-278.
- Dervilly-Pinel, G., Thibault, J. -, & Saulnier, L. (2001). Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydrate Research*, 330(3), 365-372.
- DeSimon, B. F., Perez-Ilzarbe, J., Hernasndez, T., Gómez-Cordoves, C., & Estrella, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1531-1535.
- DeVries, J. W. (2004). Dietary fiber: The influence of definition on analysis and regulation. *Journal of AOAC International*, 87(3), 682-706.
- Diáz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2006). Dietary fiber in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(1), 69-72.
- Dimitrios, B. (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(9), 505-512.
- Doco, T., & Brillouet, J. -. (1993). Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243(2), 333-343.
- Doco, T., Williams, P., Vidal, S., & Pellerin, P. (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Research*, 297(2), 181-186.
- Dongowski, G., Lorenz, A., & Prohl, J. (2002). The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and in vitro. *Journal of Nutrition*, 132(7), 1935-1944.
- Doréa, J. G., & Da Costa, T. H. M. (2005). Is coffee a functional food? *British Journal of Nutrition*, 93(6), 773-782.
- Dufour, C., & Bayonove, C. L. (1999). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 671-677.

- Dufour, C., & Bayonove, C. L. (1999). Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 678-684.
- E.Chove, B., Grandison, A., & Lewis, M. (2007). Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*, 21(8), 1379-1388.
- Ebringerova, A., Hromádkova, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, 186, 1-67.
- Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1988). Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 71(4), 808-814.
- Eraso, F., & Hartley, R. D. (1990). Monomeric and dimeric phenolic constituents of plant cell walls - Possible factors influencing wall biodegradability. *J. Sci. Food Agric.*, 51, 163-170.
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153-159.
- Estruch, R. (2000). Wine and cardiovascular disease. *Food Research International*, 33(3-4), 219-226.
- Evenepoel, P. et al. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *The American Journal of Physiology*, 277(5 Pt 1), G935-43.
- Farah, A., De Paulis, T., Trugo, L. C., & Martin, P. R. (2005). Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1505-1513.
- Farah, A., & Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 23-36.
- Felgines, C. et al. (2006). Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. *British Journal of Nutrition*, 95(5), 898-904.
- Fernández-Pachón, M. S., Villanó, D., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 113-118.
- Ferreira, R. B., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., & Teixeira, A. R. (2001). The wine proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 12(7), 230-239.
- Ficarra, R. et al. (2002). Study of flavonoids/ β -cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(6), 1005-1014.
- Finnie, C., Melchior, S., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2002). Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley. *Plant Physiology*, 129(3), 1308-1319.
- Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., & Redgwell, R. (2001). Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, 330(1), 93-101.
- Florent, C., Flourie, B., Leblond, A., Rautureau, M., Bernier, J. J., & Rambaud, J. C. (1985). Influence of chronic lactulose ingestion on the colonic metabolism of lactulose in man (an in vivo study). *The Journal of clinical investigation*, 75(2), 608-613.

- Flourie, B., Briet, F., Florent, C., Pellier, P., Maurel, M., & Rambaud, J. C. (1993). Can diarrhea induced by lactulose be reduced by prolonged ingestion of lactulose? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), 369-375.
- Flourie, B., Florent, C., Jouany, J. P., Thivend, P., Etanchaud, F., & Rambaud, J. C. (1986). Colonic metabolism of wheat starch in healthy humans. Effects on fecal outputs and clinical symptoms. *Gastroenterology*, 90(1), 111-119.
- Folin, O. & Dennis, W. (1912). On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. *Journal of Biological Chemistry*, 239-243
- Food Standards Agency (2002). McCance and Widdowson's. The composition of Foods. 6th Summary edition; compiled by Food Standards Agency and Institute of Food Research. Royal Society of Chemistry, 2004. Cambridge. UK
- Fox, G. P., Onley-Watson, K., & Osman, A. (2002). Multiple linear regression calibrations for barley and malt protein based on the spectra of hordein. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(2), 155-159.
- Fry, S. C. (1997). Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: Optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *Plant Journal*, 11(5), 1141-1150.
- Fry, S. C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *J. Exp. Bot.*, 40, 1-11.
- Fuller, E., Blaschek, W., & Franz, G. (1991). Characterization of water-soluble polysaccharides from chamomile flowers. *Planta Medica*, 57(SUPPL. 2)
- Fuller, E., Sosa, S., Tubaro, A., Alban, S., Franz, G., & DellaLoggia, R. (2000). Anti-inflammatory activity of Chamomile polysaccharides. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 10(2), 86-87.
- Gallaher, D. D., & Schneeman, B. O. (2001). Dietary fiber. *Present Knowledge in Nutrition*, 83-91.
- Garau, M. C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014-1024.
- Garcia-Conesa, M. T., Plumb, G. W., Waldron, K. W., Ralph, J., & Williamson, G. (1997). Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: Isolation, purification and antioxidant properties of 8-O-4-diferulic acid. *Redox Report*, 3(5-6), 319-323.
- García-Falcón, M. S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105(1), 248-259.
- Gerber, M. (1998). Fibre and breast cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 7(SUPPL. 2), S63-S67.
- Gerhäuser, C. (2005/9). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941-1954.
- Geypens, B. et al. (1997). Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*, 41(1), 70-76.

- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., & Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2), 76-80.
- Gibson, G. R. (1998). Dietary modulation of the human gut microflora using prebiotics. *The British journal of nutrition*, 80(4), S209-12.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Giovani, G., & Rosi, I. (2007). Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 19-24.
- Glore, S. R., VanTreeck, D., Knehans, A. W., & Guild, M. (1994). Soluble fiber and serum lipids: A literature review. *Journal of the American Dietetic Association*, 94(4), 425-436.
- Gniechwitz, D., Reichardt, N., Blaut, M., Steinhart, H., & Bunzel, M. (2007). Dietary fiber from coffee beverage: Degradation by human fecal microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 6989-6996.
- Gómez-Romero, M., Arraéz-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet. *Journal of Separation Science*, 30(4), 452-461.
- Gonçalves, F., Heyraud, A., DePinho, M. N., & Rinaudo, M. (2002). Characterization of white wine mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6097-6101.
- Goní, I., & Martín, N. (2001). Fermentación colorífica de fibra dietética y almidón resistente. *Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud*, , 311-338.
- Goní, I., & Martín-Carrón, N. (2001). Fermentación colonica. *Fibra Dietética en Iberoamérica: Tecnología Y Salud. Obtención, Caracterización, Efecto Fisiológico Y Aplicación en Alimentos*, , 311-338.
- Goní, I., & Martín-Carrón, N. (1998). In vitro fermentation and hydration properties of commercial dietary fiber-rich supplements. *Nutrition Research*, 18(6), 1077-1089.
- Gonthier, M. P. et al. (2003). Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *The Journal of nutrition*, 133(2), 461-467.
- Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Diet and the excretion and enterohepatic cycling of estrogens. *Preventive Medicine*, 16(4), 525-531.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Zemser, M., & Trakhtenberg, S. (2000/1). Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. *Nutrition Research*, 20(1), 131-139.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P., & Amiot, M. J. (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1625-1634.

- Gruppen, H., Hoffmann, R. A., Kormelink, F. J. M., Voragen, A. G. J., Kamerling, J. P., & Vliegenthart, J. F. G. (1992). Characterisation by ¹H NMR spectroscopy of enzymically derived oligosaccharides from alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. *Carbohydrate Research*, 233, 45-64.
- Gruppen, H., Kormelink, F. J. M., & Voragen, A. G. J. (1993). Water-unextractable Cell Wall Material from Wheat Flour. 3. A Structural Model for Arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 18(2), 111-128.
- Guillon, F., & Champ, M. (2000). Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33(3-4), 233-245.
- Guillotin, S. E., Bakx, E. J., Boulenguer, P., Mazoyer, J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2005). Populations having different GalA blocks characteristics are present in commercial pectins which are chemically similar but have different functionalities. *Carbohydrate Polymers*, 60(3), 391-398.
- Gulfi, M., Arrigoni, E., & Amadò, R. (2007). In vitro fermentability of a pectin fraction rich in hairy regions. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 410-416.
- Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73(2), 341-347.
- Han, J. Y., & Schwarz, P. B. (1996). Arabinoxylan composition in barley, malt, and beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54(4), 216-220.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (2007). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, , 845-850.
- Harlan, D. W., Holter, J. B., & Hayes, H. H. (1991). Detergent fiber traits to predict productive energy of forages fed free choice to nonlactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 74(4), 1337-1353.
- Heald, C. L., Ritchie, M. R., Bolton-Smith, C., Morton, M. S., & Alexander, F. E. (2007). Phyto-oestrogens and risk of prostate cancer in Scottish men. *British Journal of Nutrition*, 98(2), 388-396.
- Hegde, S., & Maness, N. O. (1996). Sugar composition of pectin and hemicellulose extracts of peach fruit during softening over two harvest seasons. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(6), 1162-1167.
- Hejgaard, J. (1982). Purification and properties of protein Z - a major albumin of barley endosperm. *Physiologia Plantarum*, 54(2), 174-182.
- Henneberg, W., & Stohmann, F. (1860). *Beiträge zur Begründung einer Rationellen Fütterung der Wiederkäuer*, 1
- Hernanz, D. et al. (2001). Hydroxycinnamic Acids and Ferulic Acid Dehydrodimers in Barley and Processed Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4884-4888.
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89-143.
- Hilz, H., Bakx, E. J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries - Characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, 59(4), 477-488.

- Hipsley, E. H. (1953). Dietary "fibre" and pregnancy toxemia. *Br Med J*, Aug 22;2(4833):420-2
- Holtekjølen, A. K., Uhlen, A. K., Bråthen, E., Sahlstrøm, S., & Knutsen, S. H. (2006). Contents of starch and non-starch polysaccharides in barley varieties of different origin. *Food Chemistry*, 94(3), 348-358.
- Höner, K., & Frerichs, N. (2007). Antioxidative capacity of different kinds of chocolate as a function of their cocoa content. *Ernährungs Umschau*, 54(9), 520-525.
- Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., & Young, T. W. (1982). Chemical and physical properties of beer. *In Malting and Brewing Science, Vol. II, Hopped Wort and Beer* Ed. Hough. J.S., , 776838.
- Hurst, P. L., Sullivan, P. A., & Shepherd, M. G. (1978). Substrate specificity and mode of action of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, 169(2), 389-395.
- Illman, R. J., Topping, D. L., Dowling, K., Trimble, R. P., Russell, G. R., & Storer, G. B. (1991). Effects of solvent extraction on the hypocholesterolaemic action of oat bran in the rat. *The British journal of nutrition*, 65(3), 435-443.
- Illman, R. J. et al. (1988). Hypocholesterolaemic effects of dietary propionate: studies in whole animals and perfused rat liver. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 32(2), 95-107.
- Ishii, T., & Matsunaga, T. (2001). Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is covalently linked to homogalacturonan. *Phytochemistry*, 57(6), 969-974.
- Ito, H. et al. (2005). Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *British Journal of Nutrition*, 94(4), 500-509.
- Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33-48.
- Jalili, T., Wildman, R. E. C., & Medeiros, D. M. (2001). Dietary fiber and coronary heart disease. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, , 281-293.
- Janovitz-Klapp, A., Richard, F., & Nicolas, J. (2007). Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, , 2903-2907.
- Jenkins, D. J. A., Jenkins, M. J. A., & Wolever, T. M. S. (1986). Slow release carbohydrate: Mechanism of action of viscous fibers. *Journal of Clinical Nutrition and Gastroenterology*, 1(5), 237-241.
- Jin, Y. -, Speers, A., Paulson, A. T., & Stewart, R. J. (2004). Effects of β -glucans and environmental factors on the viscosities of wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(2), 104-116.
- Jones, B. L., & Marinac, L. (2002). The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 858-864.
- Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., & Carle, R. (2005). A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science*, 70(2)
- Kahle, K., Kraus, M., & Richling, E. (2005). Polyphenol profiles of apple juices. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(8), 797-806.

- Kapseu, C., Mbofung, C. M. F., & Kayem, G. J. (1997). Fatty acids and triglycerides of fruit oils from *Cyperus esculentus* and *Balanites aegyptiaca*. *Sciences des Aliments*, 17(5), 531-537.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453-464.
- Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C. M., & Fahey Jr., G. C. (2005). Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Science*, 97(1), 1-12.
- Kawata, S., Tamura, S., Matsuda, Y., Ito, N., & Matsuzawa, Y. (1992). Effect of dietary fiber on cytochrome P450IA1 induction in rat colonic mucosa. *Carcinogenesis*, 13(11), 2121-2125.
- Kay, R. M. (1982). Dietary fiber. *Journal of Lipid Research*, 23(2), 221-242.
- Kern, S. M., Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A., & Garcia-Conesa, M. -. (2003). Absorption of Hydroxycinnamates in Humans after High-Bran Cereal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6050-6055.
- Kim, M., No, S., & Yoon, S. H. (2007). Stereospecific analysis of fatty acid composition of chufa (*Cyperus esculentus* L.) tuber oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(11), 1079-1080.
- Kim, M. -, Kim, Y. -, Park, H. -, Chung, J. -, Leem, K. -, & Kim, H. -. (2006). Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(6), 898-902.
- Kondo, K. c. j. Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. (0951)
- Kritchevsky, D. (1999). Dietary fiber in health and disease: An overview. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8(SUPPL.)
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A., & Williamson, G. (1997). Release of Covalently Bound Ferulic Acid from Fiber in the Human Colon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 661-667.
- Kroon, P. A., Garcia-Conesa, M. T., Fillingham, I. J., Hazlewood, G. P., & Williamson, G. (1999). Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 428-434.
- Kurz, C., Carle, R., & Schieber, A. (2008). Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry*, 106(1), 421-430.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., & Teissedre, P. -. (2001). Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3341-3348.
- Lapci k, O., Hill, M., Hampl, R., W h l k, K., & Adlercreutz, H. (1998). Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids*, 63(1), 14-20.

- Larrauri, J. A., Rupérez, P., Borroto, B., & Saura-Calixto, F. (1996). Mango peels as a new tropical fibre: Preparation and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 29(8), 729-733.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Pineapple Shell as a Source of Dietary Fiber with Associated Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 4028-4031.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Mango peel fibres with antioxidant activity. *Zeitschrift für Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung*, 205(1), 39-42.
- Larson, D. E., Hunter, G. R., Williams, M. J., Kekes-Szabo, T., Nyikos, I., & Goran, M. I. (1996). Dietary fat in relation to body fat and intraabdominal adipose tissue: A cross-sectional analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 64(5), 677-684.
- Latruffe, N., Delmas, D., Colin, D., Lançon, A., Jannin, B., & Dutartre, P. (2006). Nutritional prevention by dietary resveratrol as chemopreventive agent: Application to colorectal cancers. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17(6), 18-21.
- Lawlor, S. (2006). Beta-glucans: Discovering one of nature's healthiest assets. *Food Science and Technology*, 20(3), 40-42.
- Le Bourvellec, C., Bouchet, B., & Renard, C. M. G. C. (2005). Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1725(1), 10-18.
- Le Bourvellec, C., Le Quere, J. -, & Renard, C. M. G. C. (2007). Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7896-7904.
- Lecas, M., & Brillouet, J. (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, 35(5), 1241-1243.
- Lecumberri, E. et al. (2007). A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition*, 23(4), 332-341.
- Leloup, V., & Liardon, R. (1993). Analytical characterization of coffee carbohydrates. *Proceedings of 15th International Colloquium on the Chemistry of Coffee*, , 863-865.
- Levi, F., Pasche, C., Lucchini, F., Ghidoni, R., Ferraroni, M., & LaVecchia, C. (2005). Resveratrol and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention*, 14(2), 139-142.
- Li, H. -, & Deinzer, M. L. (2006). Structural Identification and Distribution of Proanthocyanidins in 13 Different Hops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4048-4056.
- Li, Y., Lu, J., Gu, G., Shi, Z., & Mao, Z. (2005). Studies on water-extractable arabinoxylans during malting and brewing. *Food Chemistry*, 93(1), 33-38.
- Lindorff-Larsen, K., & Winther, J. R. (2001). Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Letters*, 488(3), 145-148.
- Linssen, J. P. H., Cozijnsen, J. L., & Pilnik, W. (1989). Chufa (*Cyperus esculentus*): A new source of dietary fibre. *J. Sci. Food Agric.*, 49, 291-296.

- Llauberès, R. M., Dubourdiou, D., & Villetaz, J. C. (1987). Exocellular polysaccharides from *Saccharomyces* in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 41, 277-286.
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Suberbiola, G., & DelaTorre-Boronat, M. C. (2001). Influence of wine polysaccharides of different molecular mass on wine foaming. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 146-150.
- Lu, J., & Li, Y. (2006). Effects of arabinoxylan solubilization on wort viscosity and filtration when mashing with grist containing wheat and wheat malt. *Food Chemistry*, 98(1), 164-170.
- Lugasi, A. (2003). Polyphenol content and antioxidant properties of beer. *Acta Alimentaria*, 32(2), 181-192.
- Lunn, J., & Buttriss, J. L. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. *Nutrition Bulletin*, 32(1), 21-64.
- Macfarlane, G. T., Allison, C., Gibson, S. A., & Cummings, J. H. (1988). Contribution of the microflora to proteolysis in the human large intestine. *The Journal of applied bacteriology*, 64(1), 37-46.
- Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (1986). Starch utilization by the human large intestinal microflora. *The Journal of applied bacteriology*, 60(3), 195-201.
- Macfarlane, G. T., & Gibson, G. R. (1995). Microbiological aspects of the production of short-chain fatty acids in the large bowel. *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*, , 87-105.
- Macfarlane, G. T., & Gibson, G. R. (1994). Metabolic activities of the normal colonic flora. *Human Health: The Contribution of Microorganisms*, , 17-52.
- Macfarlane, G. T., Gibson, G. R., & Cummings, J. H. (1992). Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *The Journal of applied bacteriology*, 72(1), 57-64.
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (1997). Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*, 222, 3-9.
- Macfarlane, G. T., & Macfarlane, S. (1993). Factors affecting fermentation reactions in the large bowel. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 52(2), 367-373.
- Madhava Naidu, M., Sulochanamma, G., Sampathu, S. R., & Srinivas, P. (2008). Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. *Food Chemistry*, 107(1), 377-384.
- Maeda, T., Yamashita, H., & Morita, N. (2007). Application of xyloglucan to improve the gluten membrane on breadmaking. *Carbohydrate Polymers*, 68(4), 658-664.
- Maillard, M. -, & Berset, C. (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), 1789-1793.
- Maillard, M. -, Soum, M. -, Boivin, P., & Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *Food Science and Technology*, 29(3), 238-244.
- Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, 38(8), 771-785.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémeśy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

- Mañas, E., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1994). Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chemistry*, 50(4), 331-342.
- Mañas, E., & Saura-Calixto, F. (1993). Ethanolic precipitation: A source of error in dietary fibre determination. *Food Chemistry*, 47(4), 351-355.
- Manners, D. J., & Taylor, D. C. (1968). Studies on carbohydrate-metabolising enzymes: Part XVIII. The α -L-arabinosidase activity of almond emulsin. *Carbohydrate Research*, 7(4), 497-500.
- Martinez, K., CarreraSanchez, C., PizonesRuiz-Henestrosa, V., RodríguezPatino, J., & Pilosof, A. R. (2007). Soy protein-polysaccharides interactions at the air-water interface. *Food Hydrocolloids*, 21(5-6), 804-812.
- Martin-Villa, M. C., Vidal-Valverde, C., & Rojas-Hidalgo, E. (1981). Soluble sugars in soft drinks. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2151-2153.
- Maruyama, K. et al. (1996). O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of *Mentha*. *Phytochemistry*, 41(5), 1309-1314.
- Maruyama, K., Yamamoto, H., & Uchiyama, T. (1998). Pectins in extracellular polysaccharides from a cell-suspension culture of *Mentha*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(11), 2223-2225.
- Marzban, G. et al. (2005). Localisation and distribution of the major allergens in apple fruits. *Plant Science*, 169(2), 387-394.
- Matoh, T., Kawaguchi, S., & Kobayashi, M. (1996). Ubiquity of a borate-rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 37(5), 636-640.
- Matsuhiro, B., Presle, L. C., Saenz, C., & Urzua, C. C. (2006). Structural determination and chemical modifications of the polysaccharide from seeds of *Prosopis chilensis* Mol. (Stuntz). *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(1), 809-813.
- Matsuhiro, B., Lillo, L. E., Sáenz, C., Urzúa, C. C., & Zárate, O. (2006). Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 263-267.
- Matsui, T., Matsukawa, Y., Sakai, T., Nakamura, K., Aoike, A., & Kawai, K. (1995). Effect of ammonia on cell-cycle progression of human gastric cancer cells. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 7 Suppl 1, S79-81.
- Mayer O., J., Šimon, J., & Rosolova, H. (2001). A population study of the influence of beer consumption on folate and homocysteine concentrations. *European Journal of Clinical Nutrition*, 55(7), 605-609.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009-4017.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*,
- McCann, S. E., Moysich, K. B., & Mettlin, C. (2001). Intakes of selected nutrients and food groups and risk of ovarian cancer. *Nutrition and cancer*, 39(1), 19-28.

- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(7), 519-530.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.
- McNeil, N. I., Cummings, J. H., & James, W. P. T. (1978). Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*, 19(9), 819-822.
- McQueen-Mason, S., Le, N. T., & Brocklehurst, D. (2007). Expansins. *Plant Cell Monographs*, 6, 117-138.
- Mesquita, P. R., Picarra-Pereira, M. A., Monteiro, S., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., & Ferreira, R. B. (2001). Effect of wine composition on protein stability. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(4), 324-330.
- Mikyska, A., Hrabak, M., Hasikova, D., & Srogl, J. (2002). The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(1), 78-85.
- Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., & De Keukeleire, D. (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(6), 2249-2252.
- Millar, D., Schricker, B., Rasmusen, R., Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *American Journal of Clinical Nutrition* 34: 2248-2256
- Mongeau, R. & Brassard, R. (1990). Determination of insoluble soluble and total dietary fibre: collaborative study of rapid gravimetric method. *Cereal foods World*. 35, 319-325
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 45(2), 85-118.
- Monobe, M., & Ando, K. (2002). Drinking beer reduces radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes. *Journal of Radiation Research*, 43(3), 237-245.
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., & Fantozzi, P. (1999/12). Organic and Phenolic Acids in Beer. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32(8), 535-539.
- Montreau, F.R. (1972). Sur Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu (The content of total phenolic compounds in wines by the Folin Ciocalteu method). *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 24: 397-404
- Moreira, R. F. A., Trugo, L. C., & De Maria, C. A. B. (2000). Volatile components in roasted coffee. Part II. Aliphatic, alicyclic and aromatic compounds. *Quimica Nova*, 23(2), 195-203.
- Moreiras, O., Carbajal, A., & Cabrera, L. (1995). Tablas de composición de alimentos. *Tablas de Composición de Alimentos*,
- Mulinacci, N., Romani, A., Pinelli, P., Vincieri, F. F., & Prucher, D. (2000). Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia*, 51(5-6), 301-302.

- Mullen, W., Marks, S. C., & Crozier, A. (2007). Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3148-3157.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nakamura, A., Yoshida, R., Maeda, H., & Corredig, M. (2006). Soy soluble polysaccharide stabilization at oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 20(2-3 SPEC. ISS.), 277-283.
- Nangia-Makker, P., Conklin, J., Hogan, V., & Raz, A. (2002). Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), 187-192.
- Navarini, L., Gilli, R., Gombac, V., Abatangelo, A., Bosco, M., & Toffanin, R. (1999). Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 40(1), 71-81.
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 612-619.
- Nishio, K. et al. (2007). Consumption of soy foods and the risk of breast cancer: Findings from the Japan Collaborative Cohort (JACC) Study. *Cancer Causes and Control*, 18(8), 801-808.
- Nordkvist, E., Salomonsson, A. -, & Åman, P. (1984). Distribution of insoluble bound phenolic acids in barley grain. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 657-661.
- Nunes, F. M., & Coimbra, M. A. (2007). Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 3967-3977.
- Nunes, F., & Coimbra, M. (1998). Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. *Carbohydrate Polymers*, 37(3), 283-285.
- Nunes, F., Domingues, M. R., & Coimbra, M. (2005). Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydrate Research*, 340(10), 1689-1698.
- Omoni, A. O., & Aluko, R. E. (2005). Soybean foods and their benefits: Potential mechanisms of action. *Nutrition Reviews*, 63(8), 272-283.
- Oñate-jaén, A., Bellido-milla, D., & Hernández-artiga, M. P. (2006). Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. *Food Chemistry*, 97(2), 361-369.
- O'Neill, M. A., & Selvendran, R. R. (1980). Glycoproteins from the cell wall of *Phaseolus coccineus*. *Biochemical Journal*, 187(1), 53-63.
- Oosterveld, A., Coenen, G. J., Vermeulen, N. C. B., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2004). Structural features of acetylated galactomannans from green *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers*, 58(4), 427-434.

- Oosterveld, A., Harmsen, J. S., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2003). Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers*, 52(3), 285-296.
- Oosterveld, A., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2003). Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. *Carbohydrate Polymers*, 54(2), 183-192.
- Oosterveld, A., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 407-413.
- Oosterveld, A., Voragen, A. G. J., & Schols, H. A. (2002). Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein. *Carbohydrate Polymers*, 49(4), 407-413.
- Ordaz-Ortiz, J. J., & Saulnier, L. (2005). Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 119-125.
- Orgogozo, J. -. et al. (1997). Wine consumption and dementia in the elderly: A prospective community study in the Bordeaux area. *Revue Neurologique*, 153(3), 185-192.
- Oscarsson, M., Andersson, R., Salomonsson, A. -, & Ålman, P. (1996). Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components. *Journal of Cereal Science*, 24(2), 161-170.
- Østergaard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., & Svensson, B. (2004). Proteome analysis of barley seeds: Identification of major proteins from two-dimensional gels (p/ 4-7). *Proteomics*, 4(8), 2437-2447.
- Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., & Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.
- Owuor, P. O., & McDowell, I. (2007). Changes in theaflavin composition and astringency during black tea fermentation. *Food Chemistry*, , 251-254.
- Pagañ, J., Ibarz, A., Llorca, M., Pagañ, A., & Barbosa-Cañoas, G. V. (2001). Extraction and characterization of pectin from stored peach pomace. *Food Research International*, 34(7), 605-612.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., González, M. C., & Suárez-Lepe, J. A. (2007). Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chemistry*, 105(2), 838-846.
- Parker, M. L., Ng, A., Smith, A. C., & Waldron, K. W. (2000). Esterified phenolics of the cell walls of chufa (*Cyperus esculentus* L.) Tubers and their role in texture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6284-6291.
- Parras, P., Martínez-Tomé, M., Jiménez, A. M., & Murcia, M. A. (2007). Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, 102(3), 582-592.
- Pastorello, E. et al. (1999). The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein, , *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 520-526.

- Pätzold, R., & Brückner, H. (2006). Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Amino Acids*, 31(1), 63-72.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. -, & O'Neill, M. A. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290(2), 183-197.
- Pellerin, P. et al. (1997). Lead complexation in wines with the dimers of the grape pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 31(1), 33-41.
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. -. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277(1), 135-143.
- Pellerin, P., Doco, T., Vida, S., Williams, P., Brillouet, J., & O'Neill, M. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290(2), 183-197.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. (1996). The pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II is a major component of the polysaccharides present in fruit-derived products. In J Visser and A.G.J. Voragen, *Progress in biotechnology*(pp. 67-78)Elsevier Science B.V.
- Peng, Z., Pocock, K. F., Waters, E. J., Francis, I. L., & Williams, P. J. (1997). Taste Properties of Grape (*Vitis vinifera*) Pathogenesis-Related Proteins Isolated from Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4639-4643.
- Peréz, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1-2), 109-121.
- Pinder, R. M., & Sandler, M. (2004). Alcohol, wine and mental health: Focus on dementia and stroke. *Journal of Psychopharmacology*, 18(4), 449-456.
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Poncet-Legrand, C., Edelmann, A., Putaux, J. -, Cartalade, D., Sarni-Manchado, P., & Vernhet, A. (2006). Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 687-697.
- Possemiers, S. et al. (2006). The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *Journal of Nutrition*, 136(7), 1862-1867.
- Prasain, J. K., & Barnes, S. (2007). Metabolism and bioavailability of flavonoids in chemoprevention: Current analytical strategies and future prospectus. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 846-864.
- Prata, E. R. B. A., & Oliveira, L. S. (2007). Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1555-1560.

- Prosky, L., Asp, N. G., Schweizer, T. F., DeVries, J. W., Furda, I., & Lee, S. C. (1994). Determination of soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 77(3), 690-694.
- Qi, L., & Hu, F. B. (2007). Dietary glycemic load, whole grains, and systemic inflammation in diabetes: The epidemiological evidence. *Current Opinion in Lipidology*, 18(1), 3-8.
- Queenan, K. M., Stewart, M. L., Smith, K. N., Thomas, W., Fulcher, R. G., & Slavin, J. L. (2007). Concentrated oat β -glucan, a fermentable fiber, lowers serum cholesterol in hypercholesterolemic adults in a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 6
- Rabelo, M. C., Honorato, T. L., Gonçalves, L. R. B., Pinto, G. A. S., & Rodrigues, S. (2006). Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133(1), 31-40.
- Ravichandran, R. (2002). Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on tea quality and aroma. *Food Chemistry*, 78(1), 23-28.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rechner, A. R. et al. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212-225.
- Redgwell, R., & Fischer, M. (2006). Coffee carbohydrates. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 165-174.
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., Hediger, S., & Manez, A. (2003). Dietary fibre in cocoa shell: characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81(1), 103-112.
- Redgwell, R. J., & Hansen, C. E. (2000). Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta*, 210(5), 823-830.
- Redgwell, R. J., Trovato, V., & Curti, D. (2003). Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. *Food Chemistry*, 80(4), 511-516.
- Redgwell, R., Curti, D., Fischer, M., Nicolas, P., & Fay, L. (2002). Coffee bean arabinogalactans: acidic polymers covalently linked to protein. *Carbohydrate Research*, 337(3), 239-253.
- Redgwell, R., Trovato, V., Curti, D., & Fischer, M. (2002). Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydrate Research*, 337(5), 421-431.
- Renaud, S., & De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Renaud, S., & DeLorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339(8808), 1523-1526.
- Ribeiro, I. A., & Ribeiro, M. H. L. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, 19(4), 432-438.

- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine - Effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 17-23.
- Risso, É M., Péres, R. G., & Amaya-Farfan, J. (2007). Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*, 105(4), 1578-1582.
- Rivero, D., Perez-Magarino, S., Gonzalez-Sanjose, M. L., Valls-Belles, V., Codoner, P., & Muniz, P. (2005). Inhibition of Induced DNA Oxidative Damage by Beers: Correlation with the Content of Polyphenols and Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3637-3642.
- Robertson, J. A., DeMonredon, F. D., Dyssele, P., Guillon, F., Amado, R., & Thibault, J. -. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: A European collaborative study. *LWT - Food Science and Technology*, 33(2), 72-79.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., & Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 17(1), 3-15.
- Rodríguez-Delgado, M. -, González-Hernández, G., Conde-González, J. -, & Pérez-Trujillo, J. -. (2002). Principal component analysis of the polyphenol content in young red wines. *Food Chemistry*, 78(4), 523-532.
- Rogers, W. J., Bežard, G., Deshayes, A., Meyer, I., Petiard, V., & Marraccini, P. (1999). Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(4), 261-272.
- Rose, D. J., DeMeo, M. T., Keshavarzian, A., & Hamaker, B. R. (2007). Influence of Dietary Fiber on Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer: Importance of Fermentation Pattern. *Nutrition reviews*, 65(2), 51-62.
- Rouau, X., & Thibault, J. -. (1984). Apple juice pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 4(2), 111-125.
- Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J. (2007). Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40(8), 995-1002.
- Salys, A. A., Arthur, R., & Kuritza, A. (1981). Digestion of larch arabinogalactan by a strain of human colonic *Bacteroides* growing in continuous culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(3), 475-480.
- Salys, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(2), 319-322.

- Samaras, T. S., Camburn, P. A., Chandra, S. X., Gordon, M. H., & Ames, J. M. (2005). Antioxidant Properties of Kilned and Roasted Malts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8068-8074.
- Sano, M. et al. (1986). Effects of pu-erh tea on lipid metabolism in rats. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 34(1), 221-228.
- Sanz, M. L., Villamiel, M., & Martínez-Castro, I. (2004). Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chemistry*, 87(3), 325-328.
- Sathe, S. K. (2002). Dry bean protein functionality. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(2), 175-223.
- Sathe, S. K., Kshirsagar, H. H., & Roux, K. H. (2005). Advances in seed protein research: A perspective on seed allergens. *Journal of Food Science*, 70(6), R93-R120.
- Saulnier, L. et al. (1999). Isolation and structural determination of two 5,5'-diferuloyl oligosaccharides indicate that maize heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates. *Carbohydrate Research*, 320(1-2), 82-92.
- Saulnier, L., Marot, C., Elgorriaga, M., Bonnin, E., & Thibault, J. -. (2001). Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. *Carbohydrate Polymers*, 45(3), 269-275.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4303-4306.
- Saura-Calixto, F., & Bravo, L. (2001). Dietary fibre-associated compounds: Chemistry, analysis, and nutritional effects of polyphenols. *Handbook of dietary fibre*, , 415-435.
- Saura-Calixto, F., Garcia-Alonso, A., Goni, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: An alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.
- Saura-Calixto, F., Goni, I., Manas, E., & Abia, R. (1991). Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: Determination in grape pomaces. *Food Chemistry*, 39(3), 299-309.
- Saura-Calixto, F., Goni, I., Martín Albarrañ, C., & Pulido, R. (2002). *Fibra Dietética en la Cerveza: Contenido, Composición Y Evaluación Nutricional*,
- Saura-Calixto, F. D., & Goni, I. (2004). The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(7), 1078-1082.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Remésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130(8 SUPPL.), 2073S-2085S.

- Schneeman, B. O. (1987). Soluble vs. insoluble fiber-different physiological responses. *Food Technol*, 41(2), 81-82.
- Schols, H., Bakx, E., Schipper, D., & Voragen, A. J. (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279, 265-279.
- Schols, H., Posthumus, M., & Voragen, A. J. (1990). Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research*, 206(1), 117-129.
- Schrader, K., Kiehne, A., Engelhardt, U. H., & Maier, H. G. (1996). Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(3), 392-398.
- Schröder, H. (2007). Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(3), 149-160.
- Seifert, G. J., & Roberts, K. (2007). The biology of arabinogalactan proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 137-161.
- Sellin, J. H., & Desoignie, R. (1989). Regulation of bicarbonate transport in rabbit ileum: pH stat studies. *The American Journal of Physiology*, 257(4 Pt 1), G607-15.
- Selvendran, R. R., Stevens, B. J., & DuPont, M. S. (1987). Dietary fiber: chemistry, analysis, and properties. *Advances in food research*, 31, 117-209.
- Sendra, J. M., Carbonell, J. V., Gosalbes, M. J., & Todo, V. (1989). Determination of β -glucan in wort and beer by its binding with calcofluor, using a fluorimetric flow-injection-analysis (FIA) method. *J. Inst. Brew.*, 95, 327-332.
- Serrano, J. Tesis Doctoral. Disponibilidad intestinal de compuestos bioactivos de la dieta (polifenoles y carotenoides). 2005
- Shahidi, F., & Naczki, M. (1995). Wine. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications*, 136-148.
- Shanta-Kumara, H. M. C., Iserentant, D., & Verachtert, H. (1995). Comparative analysis of malto-oligosaccharides in different beer types by thin-layer chromatography, chemical and enzymatical analysis. *Cerevisia: Belg. J. Brew. Biotechnol.*, 20, 47-53.
- Shindo, S., Tomatsu, M., Nakda, T., Shibamoto, N., Tachibana, T., & Mori, K. (2002). Inhibition of aldose reductase activity by extracts from hops. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(3), 344-347.
- ShyamaPrasadRao, R., SaiManohar, R., & Muralikrishna, G. (2007). Functional properties of water-soluble non-starch polysaccharides from rice and ragi: Effect on dough characteristics and baking quality. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1678-1686.
- Siebert, K. J. (2006). Haze formation in beverages. *LWT - Food Science and Technology*, 39(9), 987-994.
- Siebert, K. J., Carrasco, A., & Lynn, P. Y. (1996). Formation of Protein-Polyphenol Haze in Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8), 1997-2005.
- Sierksma, A., van der Gaag, M. S., Kluft, C., & Hendriks, H. F. J. (2002). Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(11), 1130-1136.

- Silva, F., Nogueira, L. C., Gonçalves, C., Ferreira, A. A., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Teixeira, N. Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Food Chemistry*, In Press, Corrected Proof
- Singh, S., & Gupta, R. (2004). Apple juice clarification using fungal pectinolytic enzyme and gelatin. *Indian Journal of Biotechnology*, 3(4), 573-576.
- Singleton, V. L. & Rossi, J.A.(1965). Colorimetry of total phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:3. 144-158
- Smith, B., & Harris, P. (2001). Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry*, 56(5), 513-519.
- Soleas, G. J., Diamandis, E. P., & Goldberg, D. M. (1997). Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(5), 287-313.
- Soo, Y. K., Hong, J. S., Yoon, Y. L., Cho, K. -, & Yong, K. R. (2006). Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. *Journal of Korean Medical Science*, 21(5), 781-789.
- Sørensen, H. R., Meyer, A. S., & Pedersen, S. (2003). Enzymatic hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan. 1. Synergy between α -L-arabinofuranosidases, endo-1,4- β -xylanases, and β -xylosidase activities. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(6), 726-731.
- Southgate, D. A. (1969). Determination of carbohydrates in foods. I. Available carbohydrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(6), 326-330.
- Southgate, D. A. (1969). Determination of carbohydrates in foods. II. Unavailable carbohydrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 20(6), 331-335.
- Spencer, J. P., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(1), 236-241.
- Spiller, M. A. (1998). The chemical components of coffee. *Caffeine*, , 97-161.
- Stevens, J. F., Miranda, C. L., Wolthers, K. R., Schimerlik, M., Deinzer, M. L., & Buhler, D. R. (2002). Identification and in vitro biological activities of hop proanthocyanidins: Inhibition of nNOS activity and scavenging of reactive nitrogen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3435-3443.
- Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004/5). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65(10), 1317-1330.
- Stewart, D., Robertson, G. W., & Morrison, I. M. (1994). Phenolic acids dimers in the cell walls of barley. *Biological Mass Spectrometry*, 23(2), 71-74.
- Sun, C. -, Yuan, J. -, Koh, W. -, & Yu, M. C. (2006). Green tea, black tea and colorectal cancer risk: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Carcinogenesis*, 27(7), 1301-1309.
- Szmitko, P. E., & Verma, S. (2005). Antiatherogenic potential of red wine: Clinician update. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 288(5 57-5)

- Taylor, A. W., Barofsky, E., Kennedy, J. A., & Deinzer, M. L. (2003). Hop (*Humulus lupulus* L.) Proanthocyanidins Characterized by Mass Spectrometry, Acid Catalysis, and Gel Permeation Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4101-4110.
- Temple, V. J., Ojobe, T. O., & Kapu, M. M. (1990). Chemical analysis of tiger nut (*Cyperus esculentus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 261-263.
- Theander, O. & Aman, P. (1979). Studies on dietary fibres I. Análisis and chemical characterization of water soluble and water insoluble dietary fibres. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 9, 97-106
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031-1064.
- Torre, M., Rodriguez, A. R., & Saura-Calixto, F. (1995). Interactions of Fe(II), Ca(II) and Fe(III) with high dietary fibre materials: A physicochemical approach. *Food Chemistry*, 54(1), 23-31.
- Torre, M., Rodriguez, A. R., & Saura-Calixto, F. (1992). Study of the interactions of calcium ions with lignin, cellulose, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1762-1766.
- Torre, M., Rodriguez, A. R., & Saura-Calixto, F. (1991). Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 30(1), 1-22.
- Trogh, I., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2004). Isolation and characterization of water-extractable arabinoxylan from hull-less barley flours. *Cereal Chemistry*, 81(5), 576-581.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, 15(3), 219-227.
- Tuohy, K. M., Hinton, D. J. S., Davies, S. J., Crabbe, M. J. C., Gibson, G. R., & Ames, J. M. (2006). Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota - Implications for health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(9), 847-857.
- Uchiyama, T., Numata, M., Terada, S., & Hosino, T. (1993). Production and composition of extracellular polysaccharide from cell suspension cultures of *Mentha*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(2), 153-159.
- Ulltveit, G. (2000). *Korn-og Baketradisjoner*.
- Van Soest, P. J., & McQueen, R. W. (1973). The chemistry and estimation of fibre. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 32(3), 123-130.
- Vanbeneden, N., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2006/12/15). Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1136(2), 237-242.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357-381.
- Vardakou, M., Nueno Palop, C., Gasson, M., Narbad, A., & Christakopoulos, P. (2007). In vitro three-stage continuous fermentation of wheat arabinoxylan fractions and induction of hydrolase activity by the gut microflora. *International journal of biological macromolecules*, 41(5), 584-589.

- Varo, P., Company, R., & Guillem, C. (1998). Composición nutricional básica de la horchata de chufa natural. *Alimentación, Equipos Y Tecnología*, , 107.
- Vassilopoulou, E. V. et al. (2007). Optimized techniques for the extraction of grape allergens appropriate for in vivo and in vitro testing and diagnosis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(3), 360-366.
- Vernin, G., & Parkanyi, C. (1982). Mechanisms of formation of heterocyclic compounds in Maillard and pyrolysis reactions. *Chemistry of Heterocyclic Compounds in Flavours and Aromas*, , 151-207.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57-65.
- Vidal, S. et al. (2000). Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II: evidence for the backbone location of the aceric acid-containing oligoglycosyl side chain. *Carbohydrate Research*, 326(4), 277-294.
- Viëtor, R. J., Voragen, A. G. J., & Angelino, S. A. G. F. (1993). Composition of non-starch polysaccharides in wort and spent grain from brewing trials with malt from a good malting quality barley and a feed barley. *J. Inst. Brew.*, 99, 243-248.
- Vincken, J. -. et al. (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132(4), 1781-1789.
- Vinson, J. A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. R., & Bose, P. (2003). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5528-5533.
- Vis, R. B., & Lorenz, K. (1998/1). Malting and Brewing with a High β -Glucan Barley. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31(1), 20-26.
- Vis, R. B., & Lorenz, K. (1997). β -Glucans: Importance in brewing and methods of analysis. *Food Science and Technology*, 30(4), 331-336.
- Visser, J., & Voragen, A. G. J. (1996). Pectins and pectinases. *Progress in Biotechnology*, , 14.
- Vogt, J. A., Pencharz, P. B., & Wolever, T. M. S. (2004). L-rhamnose increases serum propionate in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 89-94.
- Voigt, J., Biehl, B., & Wazir, S. (1993). The major seed proteins of Theobroma cacao L. *Food Chemistry*, 47(2), 145-151.
- Voragen, A. C. J., Rolin, C., & Marr, B. U. (2003). Pectins. *Polysaccharides; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*,
- Voragen, A. G. J., Schols, H. A., Marius, J., Rombouts, F. M., & Angelino, S. A. G. F. (1987). Non-starch polysaccharides from barley: Structural features and breakdown during malting. *J. Inst. Brew.*, 93, 202-208.
- Vrhovsek, U., Mattivi, F., & Waterhouse, A. L. (2001). Analysis of red wine phenolics: Comparison of HPLC and spectrophotometric methods. *Vitis*, 40(2), 87-91.

- Vulevic, J., Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2004). Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS microbiology letters*, 236(1), 153-159.
- Wang, B., Yu, H., Chang, L., Yen, W., & Duh, P. Protective effects of pu-erh tea on LDL oxidation and nitric oxide generation in macrophage cells. *LWT - Food Science and Technology*, In Press, Corrected Proof
- Wang, J. et al. (2006). Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A β neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 20(13), 2313-2320.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21-36.
- Waters, E. J., Shirley, N. J., & Williams, P. J. (1996). Nuisance Proteins of Wine Are Grape Pathogenesis-Related Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 3-5.
- Waters, E. J., Wallace, W., & Williams, P. J. (1992). Identification of heat-unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1514-1519.
- Weisburger, J. H. (2001). Chemopreventive effects of cocoa polyphenols on chronic diseases. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 226(10), 891-897.
- Weiss, W. P., & Wyatt, D. J. (2002). Effects of feeding diets based on silage from corn hybrids that differed in concentration and in vitro digestibility of neutral detergent fiber to dairy cows. *Journal of dairy science*, 85(12), 3462-3469.
- Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J., & Organ, G. (1999). Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(2), 89-99.
- Will, F., & Dietrich, H. (1992). Isolation, purification and characterization of neutral polysaccharides from extracted apple juices. *Carbohydrate Polymers*, 18(2), 109-117.
- Wiltout, R. H., & Hornung, R. L. (1988). Natural products as antitumor agents: Direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 80(4), 220-222.
- Wrong, O. M. (1988). *Bacterial metabolism of protein and endogenous nitrogen compounds*.
- Wu, H., Dwyer, K. M., Fan, Z., Shircore, A., Fan, J., & Dwyer, J. H. (2003). Dietary fiber and progression of atherosclerosis: The Los Angeles Atherosclerosis Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78(6), 1085-1091.
- Wu, S. et al. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 506-512.
- Yajima, H. et al. (2004). Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor α and γ and reduce insulin resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33456-33462.
- Yan, T., & Agnew, R. E. (2004). Prediction of nutritive values in grass silages: II. Degradability of nitrogen and dry matter using digestibility, chemical composition, and fermentation data. *Journal of animal science*, 82(5), 1380-1391.

- Yapo, B. M., Lerouge, P., Thibault, J. -, & Ralet, M. -. (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 426-435.
- Zak, D., & Keeney, P. (1976). Changes in cocoa proteins during ripening of fruit, fermentation, and further processing of cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(3), 483-486.
- Zarra, I., & Revilla, G. (1993). Pared celular. Estructura y función. *Fisiología Y Bioquímica Vegetal*, , 1-24.
- Zhao, F., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K., & Kitanaka, S. (2003). Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(1), 61-65.
- Zhou, X. et al. (2007). Effects of soluble tea polysaccharides on hyperglycemia in alloxan-diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5523-5528.
- Zuo, Y., Chen, H., & Deng, Y. (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*, 57(2), 307-316.

APÉNDICE. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

LISTADO DE TABLAS

ANTECEDENTES.

Tabla 1 Fibra dietética en alimentos.

Tabla 2. Presencia de fibra soluble e insoluble en diferentes alimentos

Tabla 3. Recomendaciones de ingesta de fibra dietética en algunos países

METODOLOGÍA

Tabla 1. Hidrólisis ácida de patrones de compuestos fenólicos. Variación en concentración

FIBRA DIETÉTICA Y COMPUESTOS ASOCIADOS EN BEBIDAS

I. VINO

Tabla 1. Principales componentes del vino

Tabla 2. Composición fenólica típica de vinos blancos y tintos

Tabla 3. Vinos analizados

Tabla 4 Fibra dietética soluble(polisacáridos no digeribles) en vino

Tabla 5. Azúcares totales y polifenoles “retenidos” empleando “diálisis en cadena”

Tabla 6. Polifenoles determinados en los vinos seleccionados

Tabla 7. Actividad antioxidante y compuestos fenólicos totales y asociados a la FDS

Tabla 8. Polifenoles y proteína en la disolución patrón mezcla de polifenoles. Pretratamiento enzimático y post diálisis (con diferentes tratamientos)

Tabla 9. Polifenoles y proteína en diferentes vinos. Pretratamiento enzimático y post diálisis (con diferentes tratamientos)

Tabla 10. Determinación de compuestos fenólicos asociados en las hidrólisis ácidas.

Tabla 11. Polifenoles y capacidad antioxidante tras hidrólisis enzimática. Comparación con el vino y con la disolución de FDS antes de la hidrólisis.

Tabla 12. Polifenoles por CLAE tras la hidrólisis enzimática

Tabla 13. Proteína y digestibilidad de proteína en diversos vinos

CERVEZA

Tabla 1 . Composición general de cerveza Pilsner

Tabla 2. Principales compuestos fenólicos de la cerveza descritos en bibliografía

Tabla 3. Carbohidratos de la cerveza

Tabla 4. Contenido y composición de la fibra dietética en la cerveza

Tabla 5. Polifenoles determinados en las cervezas seleccionadas

Tabla 6. Polifenoles de la cerveza y asociados a la fibra. Actividad antioxidante

Tabla 7. Polifenoles totales, asociados y liberados por hidrólisis enzimática.

Tabla 8. Proteína y digestibilidad de proteína en las cervezas seleccionadas

CAFE

Tabla 1. Composición del café bebida

Tabla 2. Cambio en la composición de los carbohidratos durante el tostado

Tabla 3. Preparación de infusiones de café. Solubilidad

Tabla 4. Fibra dietética del café

Tabla 5. Constituyentes monoméricos de la FDs de las infusiones de café

Tabla 6. Compuestos fenólicos en diferentes tipos de infusión de café

Tabla 7. Compuestos fenólicos totales y asociados a la fibra. Actividad antioxidante

Tabla 8. Fenoles totales asociados y liberados por hidrólisis enzimática

Tabla 9. Compuestos fenólicos asociados a la fibra hidrolizados enzimáticamente

Tabla 10. Azúcares, compuestos fenólicos y proteína según análisis complementario

Tabla 11. Actividad antioxidante de las diferentes "fracciones" según análisis complementario

OTRAS BEBIDAS DE LA DIETA

Tabla 1. Composición del té y su infusión

Tabla 2 a Zumos analizados

Tabla 2 b Infusiones comerciales analizadas

Tabla 2c Bebidas refrescantes analizadas

Tabla 2 d. Otras bebidas

Tabla 3. Frutas empleadas en los zumos

Tabla 4. Fibra dietética soluble. Contenido y composición en zumos

Tabla 5. Fibra dietética soluble (azúcares neutros y ácidos urónicos) de las infusiones analizadas

Tabla 6. Infusiones y familias

Tabla 7. Fibra dietética soluble. Contenido y composición en bebidas refrescantes y otras bebidas

Tabla 8. Polifenoles totales y asociados. Capacidad antioxidante

Tabla 9. Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos en zumos

Tabla 10. Polifenoles asociados hidrolizados. Capacidad antioxidante en zumos

Tabla 11. Polifenoles totales y asociados. Capacidad antioxidante en infusiones

Tabla 12. Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos en infusiones

Tabla 13. Polifenoles asociados hidrolizados. Capacidad antioxidante en infusiones

Tabla 14. . Polifenoles totales y asociados. Capacidad antioxidante en otras bebidas

Tabla 15. Polifenoles totales y principales grupos de compuestos fenólicos en otras bebidas

Tabla 16. Polifenoles asociados hidrolizados. Capacidad antioxidante en otras bebidas

Tabla 17. Proteína no digerible y/o asociada en el complejo de fibra en zumos

Tabla 18. Proteína no digerible y/o asociada en el complejo de fibra en infusiones

Tabla 19. Proteína no digerible y/o asociada en el complejo de fibra en otras bebidas

FERMENTACIÓN COLÓNICA *in vitro* DEL COMPLEJO DE FIBRA EN CIERTAS BEBIDAS

Tabla 1. Fermentabilidad de diversas fuentes de fibra dietética

Tabla 2. Muestras fermentadas

Tabla 3. Fermentación *in vitro* del complejo de FDS. Producción de AGCC y porcentaje de fermentabilidad

Tabla 4. Fermentación *in vitro* del complejo de FDS. Polisacáridos no digeribles no fermentados

Tabla 5. Fermentación *in vitro* del complejo de FDS. Composición en azúcares neutros de los polisacáridos del complejo de FDS que no fermentan

Tabla 6. Fermentación *in vitro* del complejo de FDS. Evolución de los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante desde su ingesta hasta su llegada al colon

Tabla 7. Fermentación *in vitro* del complejo de FDS. Evolución de los principales grupos de fenoles y su capacidad antioxidante desde su ingesta hasta su llegada al colon.

Comparación entre la hidrólisis con celulasa y la hidrólisis producida de manera fisiológica en colon

CONTRIBUCIÓN DE LAS BEBIDAS A LA INGESTA DE FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE

Tabla 1. Ingesta de fibra dietética en la población española

Tabla 2. Bebidas de mayor consumo en la población española

Tabla 3. Contribución de las bebidas a la ingesta de fibra dietética

Tabla 4. Contribución de las bebidas a la ingesta de fibra dietética (por ración)

Tabla 5. Ingesta de fibra dietética soluble. Incluyendo bebidas

Tabla 6. Complejo de fibra dietética-polifenoles –proteína. Contribución a la dieta

ANEXO I. GRAVIMETRICAMENTE

Tabla 1. comparación de resultados gravimétricos y espectrofotométricos

T

LISTADO DE FIGURAS

ANTECEDENTES

Figura 1. Principales componentes de la fibra soluble

Figura 2. Arabinoxilano

Figura 3 Glucano

Figura 4 Homogalacturonano

Figura 5 a Ramnogalacturonano II

Figura 5 b azúcares que forman las cadenas laterales de ramnogalacturonano II

Figura 6 Ramnogalacturonano I

Figura 7. Unidad de repetición del Carragenato iotta

METODOLOGÍA

Figura 1. Principales pasos del método propuesto por Prosky

Figura 2. Principales pasos del método propuesto por Englyst y Cummings

Figura 3. Principales pasos del método para determinar fracción indigerible

Figura 4. Esquema de simulación de proceso de digestión

Figura 5. Esquema de simulación de absorción intestinal por diálisis

Figura 6. Comparación de patrones aislados . Método dinitrosalicílico.

Figura 7. Comparación de mezcla de patrones . Método dinitrosalicílico.

Figura 8. Hidrólisis para hidrolizar el complejo de fibra

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1. Esquema general del proceso experimental para aislar el complejo de fibra dietética

FIBRA DIETÉTICA Y COMPUESTOS ASOCIADOS EN BEBIDAS

I. VINO

Figura 1. Esquema de vinificación.

Figura 2. Polisacáridos presentes en vino

Figura 3. Ramnogalacturonano en forma de dímero

Figura 4. Análisis para elucidar si el RG II forma parte de la FDS del vino

Figura 5. Análisis para demostrar que los compuestos fenólicos del complejo de FDS del vino están asociados al vino

Figura 6. Cromatograma de los azúcares neutros de la FDS del vino tinto

Figura 7. Cromatograma de los azúcares neutros de la FDS del vino blanco

Figura 8. Espectro de absorbancia de vino tinto frente a su disolución de FDS

Figura 9. Cromatograma obtenido por CLAE de un vino tinto seleccionado y de su solución de fibra

Figura 10. Comparación de los cromatogramas (CLAE) de un patrón de catequina y la hidrólisis

enzimática

Figura 11 (a y b) Contribución de los polifenoles, proteína y polisacáridos no digeribles al complejo de FDS de vino

CERVEZA

Figura 1. Esquema de elaboración

Figura 2. Arabinoxilano

Figura 3. β - glucano

Figura 4. Cromatogramas de los azúcares neutros de la FDS de cerveza

Figura 5. Arabinoxilanos presentes en la FDS de cerveza

Figura 6 (6 a, 6b, 6c). Cromatogramas de las cervezas seleccionadas y de sus soluciones de fibra

Figura 7. Espectro de absorción de cerveza rubia y su correspondiente solución de fibra

Figura 8. Correlación entre ácidos hidroxicinámicos y los arabinoxilanos de la fibra

Figura 9 (9 a, 9 b, 9 c). Composición del complejo de fibra.

CAFE

Figura1. Galactomanano

Figura 2. Efectos del tostado en los polisacáridos del café

Figura 3. Esquema del método empleado para elucidar la presencia de oligosacáridos en la FD del café y posible influencia de melanoidinas

Figura 4. Cromatogramas de los azúcares neutros de la FDS del café expreso

Figura 5. Cromatogramas de los azúcares neutros de la FDS de café instantáneo

Figura 6. Composición de los polisacáridos no digeribles del café, posos, e infusión del café filtro

Figura 7 Cromatogramas de una infusión de café soluble y de su solución de fibra

Figura 8. Espectro de absorción de infusión de café soluble y su correspondiente solución de fibra

Figura 9. Cromatograma de FDS de café soluble hidrolizada frente a un patrón de ácido cafeico

Figura 10. Complejo de fibra dietética-polifenoles-proteína.

OTRAS BEBIDAS DE LA DIETA

Figura 1. Esquema general de elaboración de zumo y néctar

Figura 2. Esquema general de elaboración de te (poleo, manzanilla)

Figura 3. Esquema general obtención cacao en polvo

Figura 4. Esquema general de elaboración de bebidas refrescantes

Figura 5. Esquema general de elaboración de sidra natural

Figura 6. Esquema general de elaboración de horchata

Figura 7. Cromatograma de Az. Neutros presentes en la FDS del zumo de naranja comercial

Figura 8. Comparación de azúcares neutros de los zumos de naranja y refresco de naranja

Figura 9. Cromatograma de Az. Neutros presentes en la FDS del zumo de piña

Figura 10. Cromatograma de Az. Neutros presentes en la FDS de la infusión de poleo

Figura 11. Cromatograma de Az. Neutros presentes en la FDS de la bebida isotónica

Figura 12. Cromatograma de Az. Neutros presentes en la FDS del refresco de naranja

Figura 13. Azúcares neutros de la FDS. Comparación sidra y zumo de manzana

Figura 14. Estructura de la Neohesperidina DC

Figura 15. Estructura base de polimetoxiflavonas

Figura 16. Cromatograma por CLAE de zumo de melocoton

Figura 17. Espectro de absorbancia del zumo de naranja frente a su FDS

Figura 18. Cromatograma por CLAE de los polifenoles asociados en la FDS hidrolizada de zumo de naranja natural

Figura 19. Espectro de absorbancia de poleo frente a su FDS

Figura 20. Cromatograma por CLAE de la infusión de poleo y su correspondiente FDS

Figura 21. Cromatograma por CLAE de bebida de cola frente a su FDS

Figura 22. Cromatograma por CLAE de los polifenoles de la solución de FDS del refresco de naranja hidrolizada con celulasa.

Figura 23. Cromatograma por CLAE de los polifenoles de la solución de FDS de la bebida isotónica hidrolizada con celulasa.

Figura 24. Composición del complejo de fibra dietética soluble de las bebidas

FERMENTACIÓN COLÓNICA in vitro DEL COMPLEJO DE FIBRA EN CIERTAS BEBIDAS

Figura 1. Principales rutas fermentativas

Figura 2. Obtención del complejo de FDS en forma sólida

Figura 3. Correlación entre compuestos fenólicos asociados y fermentabilidad del complejo

Figura 4 (4 a , 4 b, 4c) Cromatogramas CGL de los Az. Neutros presentes en el líquido de fermentación en vino, café y zumo de naranja

Figura 5 (5 a, 5b, 5 c) Perfil fenólico de las diferentes muestras . Comparación entre hidrólisi con celulasa e hidrólisis producida de manera fisiológica en el colon

Figura 6 (6 a, 6b, 6c). Cromatogramas de los sobrenadantes de fermentación de los diferentes complejos de FDS frente a sus respectivos complejos hidrolizados con celulasa

Figura 7. Cromatograma del sobrenadante de fermentación del complejo de FDS de vino tinto frente a un cromatograma de un patrón de catequina

CONTRIBUCIÓN DE LAS BEBIDAS A LA INGESTA DE FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE

Figura 1. contribución a la ingesta de fibra dietética total de los principales grupos de alimentos

Figura 2. Contribución de cada grupo de bebidas a la fibra dietética soluble que aportan las bebidas a la dieta

Figura 3. Aporte de cada zumo a la FDS proveniente del grupo de zumos

Figura 4. Aporte de cada bebida alcohólica a la FDS proveniente del grupo de bebidas con alcohol.

ANEXO I. GRAVIMETRICAMENTE

Figura 1. Proceso para obtener el complejo de FDS en estado sólido

Figura 2. Fotos digitales de los complejos de fibra

ANEXO II. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

Figura 1. Muestras

Figura 2. Fotografías por microscopia electrónica de barrido